

de

PATENTES y MARCAS

CERTIFICADO OFICIAL

Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud de PATENTE de INVENCION número 9800699, presentada en este Organismo, con fecha 2 de Abril de 1998.

Madrid, 21 de mayo de 1999

El Director del Departamento de Patentes e Información Tecnológica.

M. MADRUGA

PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

THIS PAGE BLANK (USPTO)



OFICINA SPAÑOLA DE PATENTES Y

INSTANCIA DE SOLICITUD DE:

D	o ise so	ACI OL	6.6	9.
1 2	~ .	×	••	• •

FECHA Y HORA DE PRESENTACION EN O.E.P.M.

ABR -2 11:22

PATENTE DE INVENCION	☐ MODELO DE	UTILIDAD		98 ABR -2 1	1 22			
(I) SOLICITUD DE ADICION SOLICITUD DIVISIONAL CAMBIO DE MODALIDAD	(2) EXPED. PRINCIPAL O DE ORIGEN MODALIDAD NUMERO SOLICITUD FECHA SOLICITUD MODALIDAD NUMERO SOLICITUD FECHA SOLICITUD		FECHA Y HORA DE PRESENTACION EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.					
☐ TRANSFORMACION SOLICITUD EUROPEA			(3) LUGAR DE PRESENTACION MADRID			DIGO 28		
(4) SOLICITANTE(S) APELLIDOS	O DENOMINACION JUR			NOMBRE	DN			
URQUIMA, S.A.				ENTES Y MARCAS				
(5) DATOS DEL PRIMER SOLICITA	NTE	MADERIA	GENT ON					
DOMICILIO Degà Bahi, 59 LOCALIDAD BARCELONA PROVINCIA BARCELONA PAIS RESIDENCIA ESPAÑA NACIONALIDAD ESPAÑOLA	PROVINCIA BARCELONA OL.				0, 2, 6			
·—————————————————————————————————————	ANTE ES EL INVENTOR			ODO DE OBTENCION				
₹ EL SOLICITA	ANTE NO ES EL INVENTOR O L	UNICO INVENTOR NOMB	<u> </u>	NC. LABORAL NACIONALI		COD. NACION		
CARDOZA SILVA; MORALEJO LORENZO	CARDOZA SILVA; ROSA E			ENA MEXICANA MX				
	(9) TITULO DE LA INVENCION "PROMOTOR Y CONSTRUCCIONES PARA EXPRESION DE PROTEINAS RECOMBINANTES EN HONGOS FILAMENTOSOS"							
(10) INVENCION REFERENTE A PR	ROCEDIMIENTO MIC	ROBIOLOGICO SE	EGUN ART. 2	25.2 L.P. 🗆 SI	□ NO			
(11) EXPOSICIONES OFICIALES								
LUGAR			FEC	CHA				
				· 				
(12) DECLARACIONES DE PRIORIE PAIS DE ORIGEN	COD.	NIIN	1ERO	T	ЕСНА			
	PAIS				Dem			
(13) EL SOLICITANTE SE ACOGE A		'AGO DE TASAS F			□ SI	□ NO		
(14) REPRESENTANTE ISERN		TATME 13.		CODI				
DOMICILIO AVDA. PAU CASALS, 22	LOC BA	RCELONA	BR	OVINCIA ARCEONA	COD POS	5 ^{AL} 1 _j		
(15) RELACION DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN FIRMA DEL FUNCIONARIO								
□ DESCRIPCION. N.º DE PAGINAS59 □ REIVINDICACIONES. N.º DE PAGINAS18 □ DIBUJOS. N.º DE PAGINAS18 □ RESUMEN □ DOCUMENTO DE PRIORIDAD	SAS	Por mi col	ga					
☐ TRADUCCION DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD (16) NOTIFICACION DE PAGO DE	FORM	TARIAS UETE CON SECU ATO PatentIn SION	JENCIAS	FIRMA DEL SOLICHAM	TE'O REPRESE	MANTE		
Se le notifica que esta solicitud se considerará el pago de esta tasa dispone de tres meses a co BOPI, más los diez dias que establece el art. 81	retirada si no procede al pontar desde la publicación o del R.D. 10-10-86.	ago de la tasa de conce del anuncio de la conce	esión; para esión en el	Fdo.: JORGE	SERN JA	\RA		

THIS PAGE BLANK (USPTO)



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

NUM	ERO DE	sori	CITUE)			1.
	D. 9	F					
FECH	IA DE PR	ESEN	TACI	ON	• • •	₹.	ŀ

HOJA INFORMACIONES COMPLEMENTARIAS

98 ABR -2 11:22

								
(4) SOLICITANTES	APELLIDOS	O RAZON SOCI	AL		NOMBRE	 -	D	NI
(6) INVENTORES	APELLIDOS				1	NOMBRE		NAC.
GUTIERREZ MAR CASQUEIRO BLA HIJARRUBIA IB MARTIN MARTIN SISNIEGA BARR DEL RIO PERIC FAUS SANTASUS	NCO RAHIM OSO ACHO				SANTIAGO JAVIER Mª JOSE JUAN FCO. HEIDI JOSE LUIS IGNACIO	· ·		ES ES ES ES ES ES
(11) EXPOSICIONES	OFICIALES							-
LUGAR:						FECHA:		
(12) DECLARACIONI PAIS DE OR		IDAD	CODIGO	NUMERO		FECHA		
TAIS DE ON				HOMERO		, DOMA		

THIS PAGE BLANK (USPTO)



PATENTE RESUMEN Y GRAFICO

P 9 8 0 0 5 9 9

98 ABR -2 11:22

RESUMEN (Máx. 150 palabras)

Promotor y construcciones para expresión de proteínas recombinantes en hongos filamentosos. Se describe un nuevo promotor para la expresión de proteínas recombinantes en hongos filamentosos (1-740) en SEQ ID No. 1), que es el promotor gdhA del gen de la glutamato deshidrogenasa A de Aspergillus niger var. awamori, así como una nueva secuencia de ADN que codifica la glutamato deshidrogenasa (741-2245 en SEQ ID No.1). Para la expresión de proteínas recombinantes resultan especialmente útiles las construcciones de ADN que comprenden el nuevo promotor, seguido de una secuencia de ADN que codifica una proteína de fusión formada por: un gen que codifique la proteína a obtener (p. ej. la taumatina), una secuencia espaciadora tipo KEX2, y un gen altamente expresado de un hongo filamentoso. Entre las ventajas de este sistema están: altas concentraciones de proteína expresada, menores tiempos de fermentación, y utilización de una fuente de nitrógeno más económica.

GRAFICO

VER INFORMACIONES AL DORSO

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3 FECHA DE PRESENTACION

0	SOLICITANTE(S)
---	----------------

URQUIMA S.A.

NACIONALIDAD

española

DOMICILIO

Degà Bahí 59-67. 08026 Barcelona. España

(3) INVENTORIESI Rosa Elena Cardoza Silva; Roo. José Moralejo Lorenzo; Santiago Gutiérnez Martín; Javier Casqueiro; Mª José Hijamubia; Juan Roo. Martín; Heidi Sisniega; Jose Luis del Rio; Ignacio Faus

(73) TITULAR(ES)

URQUIMA S.A.

(45) FECHA DE PUBLICACION @ PATENTE DE LA QUE ES (1) N.º DE PUBLICACION GRAFICO (SOLO PARA INTERPRETAR RESUMEN) DIVISIONARIA

(5) Int. Ci.

€ TITULO

Promotor y construcciones para expresión de proteínas recombinantes en hongos filamentosos

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS Panama, 1 - Madrid 28071

(57) RESUMEN JAPORTACION VOLUNTARIA SIN VALOR JURIDICOL

Promotor y construcciones para expresión de proteínas recombinantes en hongos filamentosos

Se describe un nuevo promotor para la expresión de proteinas recombinantes en hongos filamentosos (1-740 en SEQ ID No. 1), que es el promotor gdhA del gen de la glutamato deshidrogenasa A de Aspergillus niger var. awamori, así como una nueva secuencia de ADN que codifica la glutamato deshidrogenasa (741-2245 en SEQ ID No. 1). Para la expresión de proteínas recombinantes resultan especialmente útiles las construcciones de ADN que comprenden el nuevo promotor, seguido de una secuencia de ADN que codifica una proteína de fusión formada por: un gen que codifique la proteína a obtener (p. ej. la taumatina), una secuencia espaciadora tipo KEX2, y un gen altamente expresado de un hongo filamentoso. Entre las ventajas de este sistema están: altas concentraciones de proteína expresada, menores tiempos de fermentación, y utilización de una fuente de nitrógeno más económica.



Promotor y construcciones para expresión de proteínas recombinantes en hongos filamentosos

Esta invención se refiere a mejoras en la secreción de proteínas, particularmente de proteínas de fusión, mediante tecnología de ADN recombinante, usando hongos filamentosos como huespedes. Las mejoras se refieren principalmente al uso de un nuevo promotor y de nuevas construcciones de ADN que lo contienen.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Las taumatinas son proteínas de sabor muy dulce y con capacidad de aumentar la palatabilidad (potenciación o mejora de otros sabores) de los 15 alimentos (M.Witty, J.D. Higginbotham, Thaumatin, 1994, CRC Press, Boca Ratón, Florida). Actualmente, en la industria las taumatinas se extraen de los arilos de los frutos de la planta Thaumatoccocus daniellii Benth (M.Witty, J.D. Higginbotham, 20 Thaumatin ,1994, CRC Press, Boca Ratón, Florida). Las taumatinas se pueden aislar de dichos arilos en, al menos, cinco formas diferentes (I, II, III, b y c), las cuales se pueden separar por cromatografía de intercambio iónico. Todas ellas son polipéptidos de 25 una sóla cadena de 207 aminoácidos y con un peso molecular de aproximadamente 22.000 daltons. Las taumatinas I y II, que son predominantes en los arilos y tienen secuencias muy semejantes de aminoácidos, son mucho más dulces que la sacarosa 30 (100.000 veces más dulces según una estimación). Además de ser productos naturales, las taumatinas I y II no son tóxicas, por lo que constituyen un buen sustitutivo de los edulcorantes comunes en alimentación animal o humana. 35



A pesar de sus ventajas, la utilización industrial de taumatinas de origen vegetal está muy limitada por las grandes dificultades que conlleva la obtención del fruto del que se extrae. Así, la planta productora, T. daniellii, no sólo requiere un clima tropical y una polinización por insectos, sino que además ha de cultivarse intercalada con otros árboles y, con todo, tres cuartas partes de sus flores no llegan a fructificar.

10

15

5

Aunque ha habido intentos de producir taumatinas por ingeniería genética en diferentes huespedes, hasta ahora los resultados han sido considerados desalentadores, por lo que la cantidad de taumatinas disponible industrialmente es muy escasa, y a un precio muy elevado.

Los hongos filamentosos han sido utilizados como huespedes para la expresión de proteínas recombinantes.

- Por ejemplo, <u>Aspergillus niger</u>, <u>var. awamori</u> ha sido utilizado para la producción de proteínas recombinantes, tales como la glucoamilasa, quimosina bovina, lactoferrina humana, etc.
- 25 Algunas proteínas recombinantes (por ejemplo la interleucina-6 y la taumatina) han sido muy difíciles de expresar en hongos filamentosos. La patente Europea EP 684.312 describe una proceso para la preparación de taumatina recombinante. Un problema de este proceso
- radica en que los rendimientos obtenidos son bajos en comparación a lo que se requiere para la producción industrial de taumatinas. Por lo tanto, para intentar expresar en mayores concentraciones aquellas proteínas recombinantes (por ejemplo la taumatina) que han sido
- 35 hasta ahora difíciles de obtener, resulta necesario e



interesante el desarrollo de nuevos y más eficientes sistemas de expresión.

Es conocido que las productividades a la hora de producir proteínas recombinantes pueden ser mejoradas si la proteína de interés es expresada como una proteína de fusión con otra proteína. Esta otra proteína, denominada "proteína carrier" acostumbra a ser una proteína de origen fúngico y altamente expresada. Además es interesante que esta cassette de 10 expresión esté bajo el control transcripcional de un promotor fúngico fuerte. Hasta ahora, el sistema de expresión más común y utilizado contiene el promotor y gen de la glucoamilasa de Aspergillus niger, var. 15 awamori, como promotor y gen codificante de la "proteina carrier", respectivamente (P.P. Ward et al., Biotechnology 1995, vol. 13, pp. 498-502). Sin embargo, en algunos casos la utilización de este sistema de expresión no garantiza la obtención de niveles elevados 20 de proteína recombinante. Uno de estos casos problemáticos es precisamente el de la expresión de taumatina recombinante en hongos filamentosos.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCIÓN

25

La presente invención proporciona un nuevo sistema de expresión que usa el promotor gdh del gen de la glutamato deshidrogenasa de hongos filamentosos, particularmente de Aspergillus niger, var. awamori.

30

35

Uno de los aspectos de la presente invención es un nuevo promotor para la expresión de proteínas recombinantes en hongos filamentosos, que comprende una secuencia de nucleótidos -o su complementaria-seleccionada del grupo formado por: a) la secuencia



numerada 1-740 en la adjunta SEQ ID No. 1; b) una secuencia análoga a la definida en (a); y una secuencia que, bajo condiciones estrictas, se hibrida a la definida en (a). Especialmente preferida es la secuencia numerada 1-740 en la SEQ ID No. 1, que corresponde al promotor gdhA del gen de la glutamato deshidrogenasa A de Aspergillus niger var. awamori. Pero también son objeto de la presente invención el promotor gdh del gen de la glutamato deshidrogenasa de Aspergillus niger, así como el promotor gdh del gen de la glutamato deshidrogenasa de Aspergillus niger var. awamori.

Otro aspecto de la presente invención es la nueva 15 secuencia de ADN, purificada y aislada, que codifica una proteína glutamato deshidrogenasa y que comprende una secuencia de nucleótidos -o su complementariaseleccionada del grupo formado por: a) la secuencia numerada 741-2245 en la adjunta SEQ ID No. 1; b) una secuencia que es homóloga con la definida en (a); y 20 c) una secuencia que, bajo condiciones estrictas, hibrida a la definida en (a). En una realización particular la secuencia de nucleótidos seleccionada es la definida en (a). En otra realización particular 25 la proteína codificada es una glutamato deshidrogenasa de un hongo filamentoso, siendo especialmente preferida la glutamato deshidrogenasa A de un hongo filamentoso.

30 Otro aspecto de la presente invención está constituído por las nuevas proteínas codificadas por cualquiera de las secuencias de ADN antes definidas. En una realización particular, esta proteína tiene la secuencia de aminoácidos indicada en la adjunta SEQ 35 ID No. 2.



Otro aspecto de la presente invención lo constituyen las construcciones de ADN que comprenden: a) uno de los nuevos promotores antes definidos; b) una secuencia de ADN seleccionada del grupo formado por 5 el gen de la glucoamilasa de Aspergillus niger var. awamori, el gen B2 de Acremonium chrysogenum, y cualquiera de las nuevas secuencias de ADN antes definidas; c) una secuencia espaciadora que, a su vez, contiene una secuencia procesadora KEX2; y d) un 10 gen -natural o sintético- codificador de taumatina I o II. En una realización particular, la construcción de ADN contiene el promotor que comprende la secuencia 1-740 en la adjunta SEQ ID No. 1. Son preferidas las realizaciones particulares que, en la 15 parte (b) de la construcción, contienen el gen de la glucoamilasa de Aspergillus niger var. awamori, el gen B2 de Acremonium chrysogenum, o la secuencia de ADN donde la proteína codificada es la glutamato deshidrogenasa de un hongo filamentoso. Para la 20 preparación de taumatina, son especialmente preferidas las construcciones de ADN donde la secuencia de ADN en (d) es el gen sintético de la taumatina II proveniente del plásmido pThIX, descrito en EP 684.312.

25

30

La presente invención también se refiere a los cultivos de hongos filamentosos capaces de producir taumatina, que han sido transformados con plásmidos que contienen una de las construcciones antes mencionadas. Especialmente preferidos son los cultivos donde el hongo filamentoso es <u>Aspergillus niger</u> o <u>Aspergillus niger var. awamori</u>.

También es objeto de la presente invención un 35 procedimiento de producción de taumatina que



comprende los siguientes pasos: a) preparación de un plásmido de expresión que contiene una construcción de ADN de las definidas anteriormente; b) transformación de una cepa de hongo filamentoso con dicho plásmido de expresión; c) cultivo de la cepa transformada, en condiciones nutritivas apropriadas para la producción de taumatina, bien intracelularmente, bien extracelularmente, o bien de ambas maneras simultáneamente; d) según el caso, separación y purificación de taumatina a partir del caldo de fermentación.

Como se demuestra en la realización práctica de obtención de taumatina que se detalla, y se ilustra 15 gráficamente en la Figura 12, el sistema de expresión de la presente invención tiene varias ventajas respecto a los conocidos en la técnica. Por un lado, se alcanzan concentraciones de proteína expresada de aproximadamente 100 mg/l, que son un orden de 20 magnitud superiores a las mejores descritas (p.ej., con el procedimiento descrito en EP 684.312 se alcanzan concentraciones de 5-10 mg/l; cf. I. Faus et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 1998, en prensa). Por otra parte, para una misma proteína portadora 25 ("carrier") y un mismo tiempo de fermentación, el uso del promotor de la presente invención conlleva mayor concentración de proteína expresada. Por último, y no menos importante, con las construcciones de la presente invención se puede usar una fuente de 30 nitrógeno (sulfato amónico) más económica que la que se usa habitualmente (asparagina).



35

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

Figura 1, partes A, B, y C. Representación esquemática de los pasos realizados para la construcción de la cassette de expresión B2KEX.

Figura 2. Mapa de restricción de una región de 28,7 kb de ADN de A. awamori, incluyendo al gen gdhA. Mapa de los fagos FAN1 y FAN2. Las líneas gruesas indican la zona de solapamiento entre los dos fagos que contienen el gen gdhA. pB10, pB5.5 y PB1.7 indican los fragmentos de ADN subclonados en los correspondientes plásmidos. B = BamHI, S = Sal I.

Figura 3. Mapa de restricción del fragmento XbaI-BamHI de 2,1 kb del plásmido pB5.5 que fue secuenciado. El extremo 3' del gen gdhA está localizado en la parte izquierda del inserto en pB1.7. B = BamHI, E = EcoRI, EV = EcoRV, P = PstI, S = SalI, X = XbaI.

Figura 4, partes A y B. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos deducidas de las glutamato deshidrogenasas NADP-dependientes de A. awamori, A. nidulans (número de accesión de Genebank P18819),

N. crassa (P00369), S. cerevisiae (P07262),
S. occidentalis (P29507), A. bisporus (P54387), S. typhimurium (P15111), E. coli (P00370) y C. glutamicum (P31026). Los aminoácidos idénticos aparecen sombreados. Los motivos a-i, con varios aminoácidos conservados, están identificados.

Figura 5. Complementación de la mutación en gdhA en dos cepas de A. nidulans con el gen gdhA de A. awamori. Parte A: 1, mutante de A. nidulans A686; 2, transformante A686-4; 3, transformante A686-6; 4,



transformante A686-7. Parte B. 1, mutante A. nidulans A699; 2, transformante A699-2; 3, transformante A699-3; and 4, transformante A699-4.

5 Figura 6. Experimento de "primer extension" para identificar el extremo 5' del ARNm del gen gdhA. Una banda protegida (flecha) se observa en el carril correspondiente a la reacción de extensión(carril Pe). Los carriles G, A, T, C corresponden a reacciones de secuenciación del fago M13 con el oligonucleótido ("primer") -40.

Figura 7. Análisis de "Northern blot" de los ARNm provenientes de los genes gdhA y ß-actina. A:

15 hibridación con una sonda interna al gen gdhA (fragmento PvuII de 0,694 kb). B: hibridación con la sonda del gen de la ß-actina de A. nidulans como control.

Figura 8. Análisis de "Slot Blot" del ARNm proveniente del gen gdhA de A. awamori, durante una fermentación en medio MDFA con 1% glucosa y 10 mM sulfato amónico (parte A). A efectos comparativos, también se estudió el ARNm proveniente del gen de la β-actina. Parte B: Niveles relativos de expresión del gen gdhA con respecto al gen de la β-actina. Parte C: Actividad de glutamato deshidrogenasas NADP-dependiente en aquellos mismos cultivos de los que se extrajo el ARNm.

30

35

Figura 9. Análisis de "Slot Blot" del ARNm proveniente del gen gdhA de A. awamori, durante una fermentación en medio MDFA con diferentes fuentes de nitrógeno (parte A). El medio contenía 10 mM sulfato amónico como control y ácido glutámico, glutamina,



10

15

35

nitrato sódico, nitrito sódico y asparagina, todos ellos en concentraciones de 10 mM. A efectos comparativos, también se estudió el ARNm proveniente del gen de la ß-actina. Parte B: Niveles relativos de expresión del gen gdhA con respecto al gen de la ß-actina.

Figura 10, partes A, B, y C. Representación esquemática de los pasos realizados para la construcción de la cassette de expresión GDH.

Figura 11, partes A y B. Representación esquemática de los pasos realizados para la construcción de la cassette de expresión GPD.

Figura 12. Produción (expresada como concentración CT de proteína excretada en mg/l) de taumatina de las cepas de A. niger var. awamori TB2b1-44 y TGDTh-4 en fermentador. El medio utilizado fue el MDFA

- suplementado con los componentes descritos a continuación. Cuadrados abiertos: Cepa TB2b1-44; 6.0% sacarosa, pH 6.2, "fed-batch" con asparagina. Círculos abiertos: TB2b1-44, 6.0% sacarosa, pH 6.2, "fed-batch" con sulfato amónico. Triángulos cerrados: Cepa TGDTh-
- 4; 6.0 % sacarosa, pH 6.2, "fed-batch" con sulfato amónico.

EXPOSICIÓN DETALLADA DE UN MODO DE REALIZACIÓN

30 A. Construcciones

El punto de partida para todas las construcciones que se han preparado en esta solicitud de patente es el plásmido pTIX, el cual ha sido descrito en la solicitud de patente europea EP 684.312. Este plásmido



contiene: (i) un marcador de resistencia a la sulfanilamida; (ii) una secuencia de ADN que codifica a una proteína de fusión formada a su vez por (a) el gen sintético codificando a la taumatina II, (b) una secuencia separadora ("spacer") que contiene a su vez una secuencia de procesamiento del tipo KEX2, y (c) la secuencia completa (genómica) del gen de la glucoamilasa de Aspergillus niger; (iii) la secuencia señal de secreción ("pre") y la secuencia "pro" del gen de la glucoamilasa (glaA) de Aspergillus niger, y finalmente (iv) la región promotora del gen de la glucoamilasa (glaA) de Aspergillus niger.

En el contexto de la presente invención, tres nuevas cassettes de expresión fueron preparadas, las cuales 15 contenían: (i) un marcador de resistencia a una droga (en la mayoría de casos el marcador utilizado fue el de resistencia a la fleomicina); (ii) una secuencia de ADN que codifica a una proteína de fusión formada a su 20 vez por (a) el gen sintético codificando a la taumatina II, (b) una secuencia separadora que contiene a su vez una secuencia de procesamiento del tipo KEX2 y (c) una secuencia de ADN complementario (ADNc) que codifica a la mayoría de la secuencia de 25 aminoácidos de la proteina B2 (excepto secuencias en el extremo carboxilo) de Acremonium chrysogenum; (iii) la secuencia señal de secreción del gen B2 de Acremonium chrysogenum, y (iv) tres regiones promotoras diferentes.

30

35

5

10

En todas las manipulaciones de clonaje y sub-clonaje descritas, <u>Escherichia coli</u> DH5a sirvió como huesped para todos los experimentos de transformación. <u>E. coli</u> WK6 fue utilizada como huesped para obtener ADN de simple cadena a partir de plásmidos pBluescript con el



objetivo de secuenciar.

Al. Construcción de la cassette B2KEX

5 La proteína B2 es una proteasa extracelular producida por el hongo <u>Acremonium chrysogenum</u>. Esta proteína es expresada y secretada en las etapas tardías del crecimiento de <u>Acremonium chrysogenum</u> (entre 120 y 144 horas después del inicio del crecimiento).

10

El plásmido pJE1A (Laboratorio del Prof. Juan-Francisco Martín, Universidad de León, León, España) contiene la región promotora, péptido lider (incluyendo la señal de secreción) y región codificante del gen B2 de Acremonium chrysogenum. El

- codificante del gen B2 de Acremonium chrysogenum. El gen en sí tiene 1298 pares de bases y dos intrones. Estos dos intrones no están presentes en la secuencia que ha sido subclonada en pJE1A, ya que estas secuencias fueron obtenidas a partir de ADN
- complementario (ADNc). Más adelante del codon iniciador de traducción (ATG) existe una región promotora de 477 pares de bases. Cuando Acremonium chrysogenum crece en un medio definido que contiene sacarosa y glucosa como fuentes de carbono, y
- a niveles máximos entre 72 y 96 horas después del inicio del cultivo.

Los pasos dados para la construcción de la cassette de expresión B2KEX se detallan en la <u>Figura 1</u>, partes A-C. El plásmido pJE1A se cortó secuencialmente con BamHI y NcoI , liberando un fragmento de 560 pares de bases (pb) que fue purificado en un gel de agarosa al 0,8%. Este fragmento contiene la mayoría de la región codificante del gen B2, pero excluye el centro activo



de la proteína. En paralelo, el plásmido pJL43b (J.L. Barredo, Tesis Doctoral, Universidad de León, León, España) también fue digerido con BamHI y NcoI, liberándose un fragmento de 3740 pb, el cual fue purificado en un gel de agarosa al 0,8%. Este fragmento fue ligado con el fragmento BamHI-NcoI de 560 pb proveniente de pJE1A, obteniéndose el plásmido p43bB2CT (4300 pb).

El plásmido p43bB2CT fue digerido con NcoI, tratado 10 con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I (con el objetivo de obtener extremos romos) y digerido con StuI, obteniendose un fragmento de 3874 pb, el cual fue purificado en un gel de agarosa al 0,8%. Los oligonuclotidos de simple cadena ThS1 y ThS2 (ver 15 secuencias de los oligonucleótidos más adelante) fueron utilizados, usando el plásmido pThIX como molde, para amplificar mediante la técnica de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) las secuencias KEX2, así como las secuencias de taumatina, 20 presentes en pThIX. Los primeros 18 nucleótidos presentes en ThS1 corresponden a las secuencias KEX2.

ThS1: 5'- CGA ATG AAA AGG AAA AGG ATGGCCACCTTCGAG - 3'
Arg Met Lys Arg Lys Arg

Ths2: 5'- TTA TTA GGC GGT GGG GCA - 3'

25

Un fragmento de 655 pb se obtuvo mediante PCR

utilizando el plásmido pThIX como molde y los oligonucleótidos ThS1 y ThS2 como "primers". Este fragmento de ADN fue ligado con el fragmento aislado con anterioridad y proveniente del p43bB2CT, obteniendose el plásmido p43bB2CTTh. Este plásmido (4530 pb) contiene parte del gen que codifica a la



proteína B2 fusionado a la secuencia KEX-2 y al gen sintético codificando a la taumatina II. La señal de terminación de la transcripción presente en esta construcción es la del gen cycl de Saccharomyces cerevisiae.

El plásmido p43bB2CTTh fue digerido con BamHI, tratado con fosfatasa alcalina y purificado en un gel de agarosa al 0,8%. Un fragmento BamHI-BamHI de 900 pb proveniente de pJE1A también fue aislado. La subsiguiente ligación de estos dos fragmentos de ADN resultó en el plásmido pB2KEX (5430 pb). El fragmento BamHI-BamHI de 900 pb proveniente de pJE1A contiene la secuencia promotora del gen B2 (477 pb), la secuencia del péptido lider (318 pb) y 107 pb de secuencia amino terminal del gen B2.

El plásmido pB2KEX fue digerido con XbaI, tratado con

el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I (con el objetivo de obtener extremos romos) y digerido con SalI, obteniendose un fragmento de 2400 pb que fue purificado en un gel de agarosa al 0,8%. El plásmido pLJ43b (4500 pb) fue digerido con HindIII, también tratado con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I, y finalmente digerido con XhoI. Un fragmento de 4500 pb fue purificado como antes. Finalmente, los dos fragmentos purificados que acaban de ser descritos fueron ligados, generando el plásmido pB2KTh (6900 pb; Fig. 1C).

30

35

En la última etapa, los plásmidos pB2KTh y pJL43b1 fueron digeridos con SacI y StuI, obteniendose fragmentos de 5714 y 1305 pb respectivamente, los cuales fueron purificados en un gel de agarosa al 0,8%. Estos dos fragmentos fueron ligados,



obteniendose el plásmido pB2KThb1 (7020 pb; Fig. 1C). El plásmido pJL43bl es un derivado delplásmido pJL43b en el cual el promotor que expresa el gen de resistencia a fleomicina (el PpcbC de Penicillium chrysogenum) fue substituído por el promotor gpd de Aspergillus niger, var. awamori (P. Punt et al., Gene 1990, vol. 93, pp.101-109).

Este plásmido contiene un cassette para expresar 10 taumatina que está compuesta de: (i) un marcador de resistencia a fleomicina; (ii) Una secuencia de ADN que codifica a una proteína de fusión formada a su vez por (a) el gen sintético que codifica a la taumatina II, (b) una secuencia separadora ("spacer") que contiene a su vez una secuencia de procesamiento del 15 tipo KEX2 y (c) una secuencia de ADN complementario (cADN) que codifica a la mayoría de la secuencia de aminoácidos de la proteina B2 (excepto secuencias en el extremo carboxilo) de Acremonium chrysogenum; (iii) 20 la secuencia señal de secreción del gen B2 de Acremonium chrysogenum y (iv) el promotor del gen B2 de Acremonium chrysogenum. En esta construcción particular, la expresión del gen de resistencia a la fleomicina (ble) está bajo el control del promotor del 25 gen del gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa de Aspergillus nidulans.

A2. Construcción de la cassette de expresión GDHTh

A.2.1. Clonaje de un fragmento de ADN de <u>Aspergillus</u> niger, var. awamori conteniendo el gen <u>gdh</u>A.

35

La cepa A. awamori ATCC 22342 fue utilizada como fuente de ADN y ARN. Los mutantes de A. nidulans A686 (gdhA1, yA2, methH2, galA1) y A. nidulans A699 (gdhA1,



biA1) (J.R. Kinghorn, J.A. Pateman, J. Gen. Microbiol. 1973, vol. 78, pp. 39-46) fueron obtenidos del Fungal Genetics Stock Center, y utilizados para estudios de complementación con el gen gdhA de A. awamori. La auxotrofía parcial de glutamato de estas dos cepas fue confirmada por crecimiento en un medio con ácido glutámico o con una concentración alta de sulfato amónico (100 mM) como fuente de nitrógeno. Ambos mutantes gdhA crecen muy pobremente en concentraciones altas de sulfato amónico, pero tienen un perfil de crecimiento normal cuando la fuente de nitrógeno es el ácido glutámico. La cepa E. coli NM539 fue utilizada como huesped para los derivados de fagos Lambda GEM12 (Promega Co., Wis).

15

10

5

Los hongos filamentosos fueron mantenidos de manera rutinaria en medio "Power" (F. Fierro et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 1996, vol. 43, pp. 597-604) a 30°C durante tres días. Los cultivos de siembra de A. 20 awamori y A. nidulans en medio CM (conteniendo extracto de malta; 5 g/l extracto de levadura; 5 g/l glucosa) fueron inoculados con 106 esporas/ml y crecidos a 28°C en un incubador orbital G10 (New Brunswick Scientific, New Brunswick, N.J.) durante 48 25 h. Para el aislamiento y caracterización de ARNm del gen gdhA, cultivos de A. awamori en medio MDFA (Y.Q. Shen et al., <u>J. Antibiot</u>. 1984, vol. 37, pp. 503-511) fueron incubados con un 15% de cultivo de siembra y crecidos a 30°C por 48-72 h en un agitador giratorio, 30 tal como se ha descrito anteriormente.

A.2.1.1. Genoteca de Aspergillus niger var. awamori (genómica)

35 Una genoteca de ADN total de A. awamori ATCC 22342

fue construída en un vector de bacteriofago Lambda GEM12. ADN total fue extraído y digerido parcialmente con Sau3AI, para obtener fragmentos de ADN de entre 17 y 23 kb. Este ADN fue purificado por centrifugación en un gradiente de sacarosa, ligado a los brazos del fago Lambda GEM12, y empaquetado <u>in vitro</u> mediante el uso de un sistema de empaquetado Gigapack III Gold (Stratagene) resultando en un total de 8x10⁴ fagos recombinantes.

10

5

En la siguiente etapa, y utilizando una sonda BamHI de 2,6 kb que contiene el gen gdhA de Neurospora crassa (J.H. Kinnaird, J.R.S. Fincham, Gene 1983, vol. 26, pp. 253-260), dos fagos, FAN1 y FAN2, que dieron una señal de hibridación clara, fueron aislados y purificados mediantes tres ciclos de infección. Los mapas de restricción de estos dos fagos mostraron que se solapaban en 7,2 kb. La región total de ADN clonada en estos dos fagos es de 28,7 kb.

20

15

Fragmentos BamHI de 1,7 , 5,5 y 10 kb fueron subclonados en el plásmido pBluescript KS+, dando lugar a los plásmidos pB1.7, pB5.5 y pB10, tal como se muestra en la Figura 2. Fueron secuenciados mediante 25 la generación de grupos ordenados de deleciones con el sistema "Erase-a-base" (Promega Co., Wis.), mediante digestión con la exonucleoasa III desde los extremos apropiados, seguido por la eliminación del ADN de simple cadena con la exonucleasa S1. La secuenciación 30 de los fragmentos del gen gdhA se llevó a cabo mediante el método de secuenciación de Sanger. La secuenciación de los clones de ADN complementario (ADNc), llevadas a cabo para secuenciar las uniones intrón-exón, se realizó utilizando la técnica PCR de 35 la manera siguiente: 90 ng de ADN de doble cadena



fueron secuenciados utilizando un sistema GeneAmp 2400 acoplado a un secuenciador automático ABI-PRISM 310 (Perkin Elmer). El análisis de secuencias de nucleótidos y aminoácidos por ordenador se llevó a cabo con los programas DNASTAR (DNASTAR, Inc., UK).

Las primeras rondas de secuenciación mostraron que una unidad de lectura abierta ("open reading frame", ORF1) existía en el extremo derecho del inserto de 5,5 kb de pB5.5, la cual se extendía en la región izquierda del fragmento BamHI de 1,7 kb de pB1.7, tal como se describe en la Figura 3. Los fragmentos BamHI de 5,5 y 1,7 kb fueron mapeados en detalle.

- Un fragmento XbaI-XbaI de 2,1 kb correspondiente al extremo derecho del plásmido pB5.5 fue subclonado en el plásmido pBluescript SK+, creándose el plásmido pBSGh. Más especificamente, este fragmento XbaI-XbaI de 2,1 kb se obtuvo por digestión del pB5.5 en un sitio XbaI de corte interno, y por digestión en un segundo sitio de corte en el polilinker de pBSKS+ (y muy cercano al sitio de corte BamHI que se muestra en la Fig. 3).
- Una región de 2570 nt fue secuenciada en ambas hebras. Esta región contenía la ORF1 (1380 pb), la cual comenzaba en un ATG localizado 740 pb empezando a contar a partir del extremo izquierdo del inserto en pBSGh, y se extendía hasta el final del fragmento

 BamHI de 5,5 kb, con 60 pares de bases adicionales en el fragmento de 1,7 kb adyacente. La secuencia ORF1 estaba precedida por una región de 740 nucleótidos que contenía las secuencias necesarias para el inicio y regulación de la transcripción (ver SEQ ID No 1).

 ORF1 contenía dos intrones putativos en posiciones



785-850 y 1414-1471 (según la numeración en SEQ ID No 1), los cuales mostraban estructuras lariat y secuencias de procesamiento 5' y 3' similares a las que se encuentran en otros intrones fúngicos (D.J.

5 Ballance, <u>Yeast</u> 1986, vol. 2, pp. 229-236). La presencia de dos intrones fue confirmada mediante secuenciación de las regiones de ADN correspondientes a los intrones obtenidas mediante PCR de una genoteca de ADNc de <u>A. awamori</u>, utilizando como "primers" los oligonucleótidos I_A y I_B para el intrón I, y II_A y II_B para el intrón II.

El ADNc para estos experimentos se obtuvo a partir de ARN extraído tal como se describe en otras secciones, 15 a partir de micelio que fue crecido durante 48 horas en medio MDFA. La primera y segunda hebra del ADNc fueron sintetizados utilizando un kit de síntesis de ADNc de Stratagene (La Jolla, Ca). Este ADNc fue utilizado para realizar ciclos de amplificación mediante PCR, amplificándose los fragmentos que 20 contenían las uniones exón-exón utilizando el siguiente programa: 1 ciclo a 94°C durante 5 min, 50°C durante 1 min, 72°C durante 1 min seguido de 30 ciclos aa 94°C durante 1 min, 50°C durante 1 min, 72°C durante 1 min y finalmente un ciclo a 72°C durante 8 25 min.

Oligonucleótidos:

I_A 5' ATG TCT AAC CTT CCT CAC 3'

I_B 5' ACC CTT ACC ACC ACC CAT 3'

II_A 5' CGC TTC TGT GTT TCC TTC 3'

II_B 5' GTA CTT GAA CTT GTT GGC 3'



A.2.1.2. ORF1 putativamente codifica a una glutamato deshidrogenasa NADP-dependiente

ORF1 codificaba a una proteína de 460 aminoácidos (ver SEQ ID No. 2). con un peso molecular deducido de 49,4 5 kDa, y un valor pI de 5,62. La comparación de la proteína codificada por ORF1 con otras proteínas presentes en la base de datos SWISS-PROT mostró que la proteína codificada por esta secuencia tiene una alta homología con las glutamato deshidrogenasas NADP-10 dependientes de A. nidulans (84.7% de los aminoácidos son idénticos), N. crassa (identidad del 74.4%), Saccharomyces cerevisiae (identidad del 66.5%) y Schwanniomyces occidentalis (identidad del 66.9%), tal como se muestra en la <u>Figura 4</u>. La homología es 15 extensiva a todo lo largo de la secuencia de la proteína. Todas estas proteínas son glutamato deshidrogenasas NADP-dependientes que catalizan la reducción aminativa de alfa-cetoglutarato, en 20 presencia de ATP, para formar L-glutamato. La proteína codificada por ORF1 contiene nueve motivos conservados cuando se la compara con otras glutamato deshidrogenasas provenientes de hongos y levaduras. Uno de los motivos conservados (aminoácidos 108-121) corresponde a una región implicada en el mecanismo 25 catalítico del enzima. La secuencia consenso de esta región es [LIV]-X(2)-G-G-[SAG]-K-X-[GV]-X(3)-[DNS]-[PL] (PROSITE PS00074). El residuo lisina K¹¹⁴, localizado en la región rica en GGGK¹¹⁴GG corresponde a la lisina en el centro activo de Glu/Leu/Phe/Val 30 (GLFV) deshidrogenasas. Por lo tanto, y siguiendo la nomenclatura estandarizada para estos casos, el gen que codifica a ORF1 fue denominado gdhA.



A.2.1.3.El gen clonado complementa mutantes gdhA de Aspergillus nidulans

Las cepas de A. nidulans A686 y A699 fueron transformadas según un método conocido (M.M. Yelton et 5 al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1984, vol. 81, pp. 1470-4) con el plásmido pGDHaw (7,1 kb), el cual contiene el gen gdhA de A. awamori en un fragmento XbaI de 2570 pb. Este fragmento también continene una región promotora de 740 pb y 334 pb de DNA situado 10 después de ORF1 (gen gdhA). El fragmento XbaI-XbaI de 2570 pb fue insertado en el sitio de restricción XbaI del vector fúngico p43gdh, el cual contiene un marcador de resistencia a la fleomicina bajo el control del promotor del gen gdhA de A. awamori, tal 15 como se muestra más adelante en este documento.

Siete transformantes provenientes de una transformación de A. nidulans A686 con el gen de la gdhA de A. awamori, y quince transformantes de A. 20 nidulans A699 fueron analizados en medio mínimo suplementado con concentraciones varias de sulfato amónico (10, 50 y 100 mM) como fuente de nitrógeno, y su crecimiento fue comparado al de las cepas de \underline{A} . nidulans silvestre. Como control, el crecimiento 25 también se midió en medio con 10 mM ácido glutámico. Tal como se muestra en la Figura 5, las cepas no transformadas de A. nidulans mutantes A686 and A699 crecen muy pobremente en placas con 100 mM sulfato amónico, mientras que tres transformantes escogidos de 30 una manera aleatoria crecen muy bien en este medio. El crecimiento residual de los mutantes gdh A686 y 699 de A. nidulans en sulfato amónico como fuente de nitrógeno es algo conocido (J.R. Kinghorn, J.A. Pateman, Heredity 1973, vol. 31, pp. 427) y es debido 35



a la presencia de una segunda actividad glutamato deshidrogenasa que permite un crecimiento parcial en estos mutantes.

5 <u>A.2.1.4.Actividad glutamato deshidrogenasa en los</u> mutantes

La actividad específica de glutamato deshidrogenasa (GDH) del tipo NADP-dependiente (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) fue medida haciendo un seguimiento de la aminación reductiva del α-cetoglutarato en presencia de amonio y NADPH. Se expresa en unidades de actividad enzimática por mg de proteina. La velocidad inicial de la reacción fue estimada a partir de los cambio en densidad óptica a 340 nm en un espectrofotómetro Hitachi U-2001. Una unidad de glutamato deshidrogenasa fue definida como la actividad que cataliza la oxidación de un nanomol de NADPH por minuto.

Para confirmar los resultados de complementación, la actividad glutamato deshidrogenasa NADP-dependiente fue medida en los mutantes gdhA de A. nidulans A686 y A699, y en tres transformantes escogidos al azar que habían sido complementados con el gen gdhA de A. awamori. Los resultados se muestran en la Tabla 1, y mostraron con claridad que si bien la actividad glutamato deshidrogenasa en las capas A686 y A699 estaba claramente por debajo de los límites de detección, esta misma actividad estaba presente en niveles significativos en transformantes que habían sido complementados con el gen gdhA de A.awamori, especialmente a las 24 y 48 horas de crecimiento. Algunos transformantes, como el A699-4, mostraron niveles relativamente altos de actividad glutamato



deshidrogenasa, quizás debido a la integración de más de una copia del gen gdhA en el genoma de este transformante.

5 -----

Tabla 1: Actividad glutamato deshidrogenasa NADP-dependiente (U/mg de proteína), en los mutantes gdhA A686 y A699 de A. nidulans, y en tres transformantes de cada uno de estos mutantes con el gen gdhA de

10 A. awamori.

	cepa	t = 24 h	t = 48 h	t = 72 h
	A. Awamori	550	0	. 0
15	A686	0	0	0
	A686-4	350	280	100
	A686-6	340	200	80
	A686-7	310	160	90
	A699	0.	0	0
20	A699-2	270	240	100
	A699-3	410	420	400
	A699-4	500	670	580

25 <u>A.2.1.5.Caracterización de la región promotora del gen</u> gdhA

Las secuencias de ADN localizadas más adelante del códon de iniciación de la traducción ATG fueron analizadas, y revelaron la presencia de secuencias GTATA, CTATA y TCAATC en las posiciones -316, -61 y - 17, respectivamente, con respecto al codón de iniciación de la traducción, y podrían corresponder a putativas cajas TATA y CAAT involucradas en la regulación de la expresión de este gen (ver SEQ ID No



1).

20

mM.

La identificación del lugar de inicio de la transcripción fue llevada a cabo mediante un experimento de extensión ("primer extension") con 2 µg de ARNm obtenidos a partir de micelio crecido durante 48h, tal como se muestra en la Figura 6.

El experimento de extensión utilizó como "primer" el oligonucleótido "Pe" 5'-GGGGTTCTTCTGGAAGAGGGT-3' (el cual corresponde a la secuencia de nucleótidos localizada 70 pb dentro de la región codificante). La reacción de extensión detectó una sóla banda(Fig. 8). El extremo 5' del ARNm corresponde a una timina (T) localizada 86 pb adelante del codón iniciador ATG.

A.2.1.6.El gen gdhA se transcribe como un transcrito monocistrónico de 1,7 kb, y su expresión está regulada por nitrógeno.

Con el objetivo de realizar estudios de expresión se preparó ARN total de <u>A. awamori</u> (método SDS-fenol) a partir de micelio crecido durante 12, 24, 48, 60 o 72 h en medio MDFA con 55.5 mM glucosa y 10 mM sulfato amónico como fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente. En el caso de los estudios realizados para evaluar la regulación de la expresión de este gen por diferentes fuentes de nitrógeno, el medio MDFA básico (sin sulfato amónico) fue suplementado con ácido glutámico, L-glutamina, nitrito sódico, nitrato sódico y L-asparagina a concentraciones finales de 10

Para la realización del análisis de "Northern", ARN total (5 μ g) fue resuelto en un gel de agarosa-



formaldehido al 1,2%. El gel fue transferido a una membrana de nylon (NYTRAN 0.45; Schleicher & Schuell). El ARN fue fijado mediante irradiación con rayos ultravioleta mediante una lámpara UV-Stratalinker 2400 Stratagene, La Jolla, Calif.).

5

Para los experimentos de "slot blotting", el ARN (5 μg) fue inmobilizado en un filtro (NYTRAN 0.45) mediante la acción del vacío en un aparato Bio-Dot SF 10 Microfiltration (Slot Blotting, Bio-Rad). El ARN fue fijado mediante irradiación con rayos ultravioleta tal como se ha descrito anteriormente. Los filtros fueron pre-hibridados 3 h a 42°C en formamida al 50%, 5 x solución de Denhardt, 5 x SSPE, 0.1% SDS, 500 μg de ADN de esperma de salmón desnaturalizado por ml, e 15 hibridados en el mismo tampón conteniendo 100 μg de ADN de esperma de salmón desnaturalizado por ml a 42°C durante 18 h, usando como sonda un fragmento de ADN (0,694 kb PvuII) interno al gen gdhA de A. awamori. 20 Los filtros fueron lavados una vez en 2 x SSC, 0.1% SDS a 42°C durante 15 min, una vez en 0.1 x SSC, 0.1% SDS a 42°C durante 15 min, y una vez más en 0.1 x SSC, 0.1% SDS a 55°C durante 20 min. Finalmente se llevó a cabo autoradiografía con película de rayos -X de 25 Amersham. ARNm fue purificado a partir de ARN total utilizando un kit de aislamiento "Poly(A) Quick" (Stratagene, La Jolla, Calif.).

El análisis de "Northern" de la transcripción del gen

gdhA reveló que está fuertemente expresado como un
transcrito (ARNm) de 1,7 kb, con un tamaño ligeramente
superior al ARNm del gen de la ß-actina, tal como se
muestra en la <u>Figura 7</u>. Dado que ORF1 contiene 1380
nt, este tamaño de transcrito indica que el gen gdhA
se expresa como un transcrito monocistrónico.



Dado que en todos los carriles de la Fig. 7 se cargó la misma cantidad de ARN total, la conclusión es que los niveles de ARNm del gen gdhA en la célula son más altos que los del gen de la ß-actina (flechas), lo cual indica que el promotor de la glutamato deshidrogenasa es áltamente eficiente.

Con el objetivo de determinar el perfil de expresión del gen gdhA durante el curso del crecimiento de A. 10 awamori, se comparó la intensidad de la señal de hibridación a una sonda gdhA con la intensidad de hibridación a una sonda ß-actina, en condiciones de crecimiento en medio MDFA con sulfato amónico (Figura 8A). La intensidad de estas señales fue 15 entonces expresada como una relación entre las CPMs en la banda que hibrida con la sonda gdhA y las CPMs en la banda que hibrida con la sonda ßactina(Figura 8B). Los resultados indican que la expresión de los dos genes (gdhA y ß-actina) está 20 asociada al crecimiento de A. awamori, pero mientras que niveles de ARNm de la ß-actina eran detectables en la célula hasta las 96 horas de crecimiento, los niveles de ARNm del glutamato deshidrogenasa se reducían drásticamente después de 48 horas de iniciado 25 el crecimiento.

La actividad enzimática del glutamato deshidrogenasa detectada cuando A. awamori crece en medio MDFA con 10 mM sulfato amónico como fuente de nitrógeno en diferentes tiempos de cultivo aparece en la Fig. 8C. Se detecta un descenso espectacular de la actividad enzimática del glutamato deshidrogenasa entre 24 y 48 horas después de haberse iniciado el cultivo, lo cual está en perfecta sincronía con los resultados mostrados en la Fig.8B referentes a los niveles de



ARNm del gdhA en diferentes tiempos de cultivo.

El enzima glutamato deshidrogenasa tiene un papel central en la utilización de nitrógeno por parte de A. awamori. Por lo tanto también fue de interés estudiar 5 la posible regulación de la expresión del gdhA por diferentes fuentes de nitrógeno. Tal como se muestra en la Figura 9, los niveles de ARNm del gdhA fueron muy altos cuando se utilizó como fuente de nitrógeno NH4 o asparagina. El ácido glutámico inhibió la 10 transcripción del gen del gdhA, mientras que niveles intermedios de expresión (normalizados con respecto al gen de la ß-actina) fueron observados en medio que contenía como fuente de nitrógeno nitrato, glutamina o 15 nitrito. Estos resultados indican que la glutamato deshidrogenasa NADP-dependiente está sujeta a una fuerte regulación por nitrógeno al nivel transcripcional.

La Tabla 2 muestra la actividad glutamato 20 deshidrogenasa detectada en cultivos de 24 horas crecidos en medio MDFA con diferentes fuentes de nitrógeno, todas ellas en concentraciones de 10 mM. La actividad más elevada (por ml de cultivo) fue detectada en cultivos que utilizaban como fuente de 25 nitrógeno NH4 o asparagina. Además, estas dos fuentes de nitrógeno favorecían crecimientos rápidos de A. awamori. Cuando los resultados se expresaron por unidad de proteína presente en los extractos celulares, la actividad específica más alta se detectó 30 en medio MDFA con nitrato como única fuente de nitrógeno. Esto es debido a que en presencia de nitrato, A.awamori crece muy lentamente. La actividad más baja se observó en medio MDFA con glutamato como fuente de nitrógeno, confirmando los resultados 35



obtenidos anteriormente al nivel de la transcripción.

Tabla 2: Actividad glutamato deshidrogenasa NADPdependiente en cultivos de <u>A. awamori</u> crecidos durante 24 horas en medio MDFA suplementado con diferentes fuentes de nitrógeno.

10	Fuente nitrógeno (10mM)	Act. total (U/ml)	Act. específica (U/mg proteina)
	Amonio	1450	800
	Acido glutámico	330	280
	glutamina	1100	600
15	nitrito	990	660
	nitrato	1150	1680
	asparagina	1300	720

20 A.2.2. Construcción del cassette de expresión GDHTh

Una vez fue localizada la región del promotor del gen gdhA, se construyó un cassette de expresión de taumatina similar al que se ha descrito anteriormente.

25 El plásmido pBSGh se usó como molde para obtener un fragmento de ADN de 750 pb correspondiente a la región promotora del gen gdhA. Este fragmento se obtuvo por amplificación de ADN utilizando los oligonucleótidos gdh1 y gdh2 y el enzima Pfu (Stratagene).

gdh1: 5' - TTTT GTCGAC TTG CGA CGG CGT ATT GCT - 3'
Sal I

gdh2: 5' - TTTT CCATGG TCT GAA GGG GAG GAT TGA - 3'
Nco I



Este fragmento de ADN amplificado se digerió con SalI y NcoI y se purificó en un gel de agarosa al 0,8%.

El plásmido pJL43 (un derivado del pJL43b, Dr. José Luis Barredo, tesis doctoral, Universidad de León, León, España) fue digerido con SalI y NcoI y se purificó en un gel de agarosa al 0,8% un fragmento de gran tamaño (3740 pb). Este fragmento de DNA fue entonces ligado con el fragmento SalI-NcoI previamente amplificado, dando lugar al plásmido p43gdh (4500 pb), dónde el promotor pcbC de Penicillium chrysogenum ha sido sustituído por el promotor gdhA de Aspergillus niger, var. awamori.

En la siguiente etapa, el plásmido p43gdh fue digerido 15 con NcoI, procesado con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I y luego con fosfatasa intestinal de ternera (CIP). Paralelamente, se amplificó mediante la técnica de PCR un fragmento de 1140 pb conteniendo el gen de la proteína B2, utilizando el plásmido pJE1A 20 como molde y los oligonucleótidos NTB2b y CTB2b como "primers". Este fragmento de 1140 pb fue digerido con BamHI y luego tratado con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I. De esta mezcla de reacción se purificó en un gel de agarosa al 1,0 %, un fragmento 25 de ADN de 425 pb que contiene las secuencias del extremo amino del gen B2. Este fragmento de ADN se unió, mediante una ligación de extremos romos, al fragmento de ADN del p43gdh anteriormente descrito, dando lugar al plásmido p43gdhB2, donde el corte BamHI 30 que se muestra en la <u>Figura 10</u> ha sido regenerado. Este plásmido tiene un tamaño de 4925 pb y contiene el promotor gdhA fusionado "en fase" al extremo amino terminal del gen B2.

35

5



El siguiente paso para la construcción del cassette completo de expresión fue la adición del segundo fragmento del gen B2, la secuencia KEX2 y el gen sintético de la taumatina II. Para esta parte del trabajo se utilizó el plásmido pB2KEX.

El pB2KEX fue digerido con XbaI, tratado con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I y finalmente digerido con BamHI. Se purificó de un gel de agarosa al 0,8 % un fragmento de 4637 pb. De la misma manera, el plásmido p43gdhB2 fue digerido con SalI, tratado con el fragmento Klenow de ADN polimerasa I y finalmente digerido con BamHI. Se purificó de un gel de agarosa al 0,8 % un fragmento de 1173 pb. La ligación de estos dos fragmentos dió lugar al plásmido pGDHTh (5810 pb), en el que se creó un nuevo sitio de restricción SalI. Esto permite que pueda obtenerse el cassette GDHTh completo como un fragmento SalI-SalI de 2170 pb.

20

25

Empezando con el plásmido pGDHTh, se construyeron dos nuevos plásmidos. El primero fue el p43GDTh, construído de la siguiente forma. El plásmido pJL43 se linearizó por digestión con SalI y se ligó al fragmento SalI-DraI de 2170 pb del pGDHTh (ver Fig.10, parte B).

Semejantemente, el plásmido pGD71 se construyó como sigue: el plásmido pAN7-1 (P.J. Punt et al., J. Biotecnol. 1990, vol. 17, pp. 19-34) fue digerido con XbaI, tratado con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I, y finalmente digerido con HindIII, purificándose de un gel de agarosa al 0,8%. De la misma manera, el plásmido pGDHTh se digirió con Ecl136II(o SacI*, una variante de SacI de Fermentas que reconoce el sitio de restricción estándar de SacI pero



que deja extremos romos), HindIII y DraI. Se purificó de un gel de agarosa un fragmento de 2175 pb. La ligación de estos dos fragmentos dió lugar al plásmido pGD71 (ver Fig. 10, parte C).

5

Los plásmidos p43GDTh y pGD71 contienen un cassette para expresar taumatina que se compone de: (i) una secuencia de DNA la cual codifica una proteína de fusión formada por (a) el gen sintético de la taumatina II, (b) una secuencia "spacer" que contiene 10 una secuencia de procesamiento KEX2, y (c) una secuencia de cDNA que codifica la mayor parte de la proteína B2 (excepto secuencias en el extremo COOH) de Acremonium chrysogenum; (ii) la secuencia señal del gen B2 de Acremonium chrysogenum, (iii) la región 15 promotora del gen glutamato deshidrogensa de Aspergillus niger, var. awamori, y (iv) un gen de resistencia a una droga que puede utilizarse como marcador de transformación. El plásmido p43GDTh tiene 20 el gen de resistencia a la fleomicina (fleo) bajo el control del promotor pcbC de Penicillium chrysogenum. El plásmido pGD71 contiene el gen de resistencia a la higromicina B bajo el control del promotor del gen gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa de Aspergillus 25 nidulans.

A.3. Construción del cassette de expresión GPDTh

El cassette de expresión GPDTh es similar al cassette de expresión B2KEX, excepto que el promotor B2 de Acremonium chrysogenum ha sido sustituído por el promotor del gen del gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (nombrado desde este momento "gpd") de Aspergillus nidulans.



La región promotora completa del gen gpd está presente en el plásmido pAN52-1 (P.J. Pat et al., <u>J. Biotecnol.</u> 1990, vol. 17, pp. 19-34). Se ha subclonado un fragmento SacI-NcoI (880 pb) de pAN52-1, generando el pJL43b1.

El plásmido pJL43bl fue digerido primero con NcoI, fue tratado luego con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I y posteriormente con fosfatasa intestinal de ternera (CIP), como se muestra en la Figura 11. De la misma manera, se obtuvo un fragmento de ADN de 1140 pb por amplificación de ADN empleando la técnica de la PCR, y utilizando el pJE1A como molde y los oligonucleótidos NTB2b y CTB2b como "primers". Este fragmento de ADN fue digerido con BamHI y procesado con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I, dando lugar a un fragmenta de 425 pb que fue purificado en un gel de agarosa al 0,8%. La ligación final dió lugar al plásmido pb1B2 (ver Fig. 11).

20

NTB2b: 5' - ATG CGT GCT GCT ACT CTC - 3'
CTB2b: 5' - CTG GCC GTT GTT GAT GAG - 3'

Como anteriormente se hizo con el cassette GDHTh, el paso siguiente en la construcción de un cassette completo de expresión fue la adición de la segunda porción del gen B2, la secuencia KEX2 y el gen sintético de la taumatina II. Para esta parte del trabajo, se utilizó de nuevo el plásmido pB2KEX.

30

35

El pB2KEX fue digerido secuencialmente con XbaI, se trató con el fragmento Klenow de ADN polimerasa I y finalmente fue digerido con BamHI. Se purificó un fragmento de 4637 pb de un gel de agarosa al 0,8%. De la misma manera, el plásmido pb1B2 fue secuencialmente



digerido con BamHI y Ecl36II(o SacI*) (dejando extremos romos), y se purificó un fragmento de 1300 pb de un gel de agarosa de al 0,8%. La ligación de estos dos fragmentos dió lugar al plásmido pGPDTh (5800 pb).

5

10

15

20

En la siguiente etapa, se aisló el cassette GPDTh del pGPDTh por digestión con Ecl36II(o SacI*)-HindIII y DraI, obteniéndose un fragmento de ADN de 2800 pb. De la misma manera, el plásmido pB2KThb1 fue secuencialmente digerido con BamHI, tratado con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I y finalmente digerido con HindIII. Se aisló un fragmento de 4500 pb de un gel de agarosa al 0,8%. El plásmido resultante de la ligación de estos dos fragmentos fue nombrado pGPThb1.

Este plásmido contiene un cassette para la expresión de taumatina que es idéntico al cassette de expresión B2KEX excepto en el promotor del gen B2 de <u>Acremonium chrysogenum</u> que ha sido reemplazado por el promotor del gen gpdA de Aspergillus nidulans.

B. Cepas empleadas y protocolos de tranformación

La cepa de <u>Aspergillus niger, var. awamori</u> NRRL312 se obtuvo de la Colección de Cultivos tipo Americana (ATCC). Utilizando técnicas estándar de mutagénesis con nitrosoguanidina (NTG), se obtuvo un derivado de esta cepa, que se llamó LpR66. Esta cepa mutante secreta al medio de cultivo una exoproteasa inactiva aspergillopepsina A (nombrada desde este momento "pepA"). En todos los experimentos de transformación que se describen a continuación la cepa utilizada fue la cepa Aspergillus niger, var. awamori LpR66.



Los tres cassettes de expresión anteriormente descritos se emplearon para transformar la cepa <u>Aspergillus niger</u>, var. awamori LpR66.

- 5 En todos los experimentos de transformación simples, se usó el antibiótico fleomicina como marcador de selección. La cepa LpR66 puede crecer en placas que contienen 20 μg/ml de fleomicina. Por lo tanto, todos los transformantes se seleccionaron en placas con 25 μg/ml del antibiótico. El medio de regeneración que se utilizó es el TSAS, el cual contiene 30 g/l de Triptona-Soja (Difco), 103 g/l de sacarosa (Difco) y 1,5% agar (Difco).
- 15 El protocolo de transformación fue similar al descrito por Yelton (referenciado con anterioridad) con algunas modificaciones. Se inoculó una placa conteniendo medio "Power" con 10^7 esporas. Esta placa se incubó durante 72 horas a 30°C. Pasado este tiempo las esporas se 20 rasparon de la placa y se inocularon en 100 ml de medio CM (matraz de Erlermeyer de 500 ml). La incubación fue durante 16-18 horas a 250 rpm y 28°C. El micelio obtenido de este crecimiento se filtró a través de un filtro de nylon de 30 µm (Nytal) y se 25 lavó con tampón fosfato sódico 10 mM (pH 5.8), el cual también contenía sulfato magnésico al 0,6 M. Un gramo de micelio se re-suspendió en "tampón de protoplastos" (tampón fosfato sódico 10 mM (pH 5.8) y sulfato magnésico 1,2 M). Se añadió un volumen igual de tampón 30 conteniendo el enzima "Lysing" (Sigma), para dar una concentración final de 3 mg/ml de enzima. La solución de micelio se dejó incubar durante 3-4 horas a 100 rpm
- 35 microscopio. Los protoplastos se filtraron, lavaron y

y 30°C hasta la formación de protoplastos. Esta

formación se monitorizó por visualización al



finalmente se resuspendieron en solución de STC, hasta una concentración final de 10^8 protoplastos/ml.

Se mezclaron 100 μ l de solución de protoplastos con 5 $10-20 \mu g$ de DNA y se mantuvo en hielo durante 20 minutos. Pasado este tiempo, se añadieron 500 μ l de PTC, y la mezcla se dejó a temperatura ambiente otros 20 minutos. Entonces se añadieron 600 μ l de medio STC y la mezcla de transformación se alicuotó en 10 diferentes tubos. Finalmente, se añadió la solución de antibiótico de fleomicina y el medio TSAS que contiene agar. El contenido de los tubos se homogeneizó suavemente y se virtó a las placas de TSAS conteniendo fleomicina. Las placas se incubaron a 30°C hasta la 15 visualización de transformantes como colonias individuales. En los casos que se utilizó higromicina B como marcador de selección el procedimiento fue análogo.

20 La linearización de todos los plásmidos que se han descrito dió como resultado un aumento en la eficiencia de la transformación del orden de 4 veces comparado con las tranformaciones realizadas con los plásmidos sin linearizar. Por lo tanto en la mayoría de los experimentos de transformación se usaron plásmidos linearizados.

Se obtuvieron y analizaron varios tranformantes. Las selecciones iniciales se realizaron en placas

30 conteniendo 25 µg/ml de fleomicina. La confirmación de los transformantes seleccionados se hizo utilizando concentraciones de fleomicina de hasta 200 µg/ml.

Los transformantes se analizaron por PCR para detectar 35 si el gen de la taumatina II se había incorporado al



20

genoma esencialmente como está descrito (cf. EP 684.312). Posteriormente aquellos transformantes que dieron positivo se analizaron para la expresión de taumatina mediante análisis de inmunoblot y ELISA (enzyme-linked immaoassay) también como está descrito (cf. EP 684.312).

C: Cepas recombinantes productoras de taumatina

10 <u>C.1. Materiales</u> y métodos

C.1.1. Medio de cultivo

Medio CM: extracto de malta, 5 g/l; extracto de levadura, 5 g/l; glucosa, 5 g/l.

Medio SMM: 8% citrato sódico; 1,5% (NH₄)₂SO₄; 0,13% NaH₂PO₄.2H₂O; 0,2% MgSO₄.7H₂O; 0,1% Tween 80; 0,1% uridina, 0,1% antiespumante AF y 7% leche de soja. La fuente de carbono(glucosa, sacarosa, maltosa, etc.) se encuentra en una concentración final del 15%. El pH del medio se adjusta a 6,2 con H₂SO₄.

Medio MDFA: 1,2% L-asparagina; 0,8% solución de sales I [2% Fe(NH₄)₂(SO₄)₂.6H₂O]; y 14,4% de solución de sales II [10,4% K₂HPO₄; 10,2% KH₂PO₄; 1,15% Na₂CuSO₄.5H₂O; 0,2% MgSO₄.7H₂O; 0,02% ZnSO₄.7H₂O; 0,005% CuSO₄.5H₂O; 0,05% CaCl₂.2H₂O]. La fuente de carbono utilizada fue bien maltosa (generalmente al 6,5%) o bien un mezcla de sacarosa (3,6%) y glucosa (2,7%). Otras cantidades de fuente de carbono se indican en cada experimento que se describe. El pH inicial de este medio es 6,5.



C.1.2. Análisis de la fermentación

5

Los estudios de crecimiento y expresión se realizaron en medios SMM y MDFA, primero en matraces de Erlermeyer, y despés en varios fermentadores equipados con sistemas de medida y control para el seguimiento de las variables: agitación, oxígeno disuelto, pH, antiespumante y nivel de cultivo.

10 Los experimentos se hicieron en matraces de 1 litro con un volumen de trabajo de 150 ml. Se inoculó a una concentración final de 3 x 10⁵ esporas/ml. La agitación fue de 150 rpm, y la temperatura de incubación fue de 30°C. El medio utilizado fue SMM o MDFA.

Los experimentos realizados en fermentador fueron análogos a los realizados en matraz de Erlermeyer, excepto que el pH del medio se mantuvo constante a un valor predeterminado, ajustándose por la adición automática de 30% NaOH o 0,5N H₂SO₄.

C.1.3. Métodos analíticos

- 25 Se tomaron muestras de 2-10 ml del cultivo de fermentación a diferentes tiempos y se procesaron para determinar el peso seco, la concentración de taumatina, maltosa y glucosa presentes.
- 30 El peso seco se determinó pasando una muestra a través de un pre-filtro (Nucleopore, Cat.No. 211114). El material biológico retenido en el pre-filtro se lavó con 40 ml de etanol puro y 50 ml de agua destilada. Posteriormente fue incubado a 90°C hasta peso

35 constante. El filtrado se alicuotó y congeló para los



30

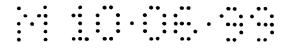
35

subsiguientes análisis.

La concentración de taumatina en el caldo de cultivo se determinó por el método del "enzyme-linked 5 immunoassay" (ELISA) y por "inmunoblotting" (Western blot), esencialmente como está descrito (cf. EP 684.312), utilizando un anticuerpo policional antitaumatina. Para el "inmunoblotting", a veces las muestras se concentraron de la siguiente forma: se 10 mezclaron 500 μ l de filtrado con un volumen igual de ácido tricloroacético al 10% (TCA), y se congelaron durante 12 h. Entonces la muestra se llevó a temperatura ambiente y se centrifugó en una centrifuga de sobremesa (15,000 rpm; 20 min. 4°C). El 15 precipitado que se recupera contiene todas las proteínas presentes en la muestra. Finalmente, este precipitado fue resuspendido en un tampón de carga para proteínas, hervido durante 5 minutos, y cargado en un gel SDS-PAGE tal como está descrito (cf. EP 20 684.312).

Aproximadamente 1 ml de filtrado se usó para la determinación de glucosa y maltosa. Los niveles de glucosa se determinaron utilizando un kit de SIGMA DIAGNOSTICS (Procedure number 510).

La concentración de maltosa en el caldo de cultivo se determinó del siguiente modo: se pusieron 250 μ l de muestra filtrada en un tubo previamente enfriado; se añadieron entonces 1,250 ml. de solución de antrona (preparada disolviendo 2 g de antrona en 50 ml de etanol absoluto y añadiendo 950 ml de 75% H_2SO_4), y se mantuvo en hielo durante 5 minutos. Pasado este tiempo, la muestra se transfirió a un baño de agua hirviendo, y se incubó durante 10 minutos. Finalmente



las muestras se enfriaron de nuevo y se leyó la absorbancia a 625 nm. La concentración de maltosa se determinó por comparación con una curva de calibración calculada midiendo la absorbancia de soluciones de maltosa de concentraciones conocidas (rango: 0 - 0.2 g/l).

C.2. Cepas productoras de taumatina

10 C.2.1. Cepa TB2b1-44

5

Esta cepa es una derivada de la Lpr66 que fue obtenida por transformación de LpR66 con el plásmido de expresión pB2KTh-b1. Este cassette de expresión contiene el gen sintético de la taumatina II bajo el

- contiene el gen sintético de la taumatina II bajo el control del promotor de la proteína B2 de <u>Acremonium chrysogenum</u>. En matraces de Erlermeyer con medio MDFA esta cepa secreta 6-8 mg taumatina/l.
- 20 Los estudios para su optimización se llevaron a cabo en un fermentador de 5-litros New Brunswick. El inóculo se obtuvo haciendo crecer la cepa durante 40 horas a 30°C en medio CM.. De este inóculo se usaron 450 ml para sembrar el fermentador de 5 litros
- 25 (volumen de trabajo 4.5 litros).Las RPMs se variaron entre 250 y 500, en función del estado de oxígeno del sistema.
- Se probaron diferentes parámetros, tales como el pH

 del medio y las fuentes de carbono y nitrógeno.

 Experimentos representativos se describen en la <u>Figura</u>

 12.
- (1) Crecimiento en medio MDFA a un 6,0 % de sacarosa y 35 L-asparagina como fuente de nitrógeno. El set-point



10

20

30

35

del pH se estableció a 6,2, y un se instaló un sistema de "fed-batch". Las adiciones se realizaron a las 36, 48, 60 y 72 horas después del comienzo de la fermentación. En cada adición se introdujeron 45 ml de solución de sacarosa a 0,5 g/ml.

(2) Las condiciones fueron las mismas que las descritas en el apartado anterior, excepto que la L-asparagina fue reemplazada por sulfato amónico (conservándose las cantidades molares para ambos experimentos) como fuente de nitrógeno.

La mejor productividad se obtuvo bajo las condiciones descritas en el apartado 1, con asparragina como fuente de nitrógeno, y con 6% de sacarosa como fuente de carbono, con 4 adiciones de sacarosa cada 12 h después de 36 h de fermentación. Bajo estas condiciones, se obtuvieron producciones de 100 mg taumatina/1.

C.2.2. Cepa TGDTh-4

Esta cepa, se depositó según el Tratado de Budapest con fecha 25 de marzo de 1998 (25.03.98) y con número 25 de acceso CECT20241, en la siguiente institución:

> Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) Edificio de Investigación, planta baja, no. 34 Universidad de Valencia Campus de Burjasot 46100 Valencia, España.

Se trata de un derivado de la Lpr66 obtenido por transformación de LpR66 con el cassette de expresión p43GDTh. Este cassette de expresión contiene el gen



sintético de la taumatina II bajo el control del promotor del gen gdhA de Aspergillus niger, var.

awamori. En matraces de Erlermeyer con medio MDFA (con 6,0% de sacarosa) esta cepa secreta 6-8 mg.

5 taumatina/l.

También se realizaron experimentos bajo condiciones controladas en un fermentador de 5-litros New Brunswick, como se ha descrito anteriormente para cepa TB2b1-44. Se utilizó sulfato amónico en lugar de 10 asparagina como fuente de nitrógeno, empleándose la misma relación molar. En este experimento, mostrado también en la Figura 12, se probaron las siguientes condiciones: la cepa TGDTh-4 se hizó crecer en medio 15 MDFA suplementado con 6% de sacarosa y sulfato amónico como fuente de nitrógeno. El set-point de PH se estableció a 6,2 y se instaló también un sistema de "fed-batch". Las adiciones se hicieron a las 36, 48, 60 y 72 h después del inicio de la fermentación. En 20 cada adición se introdujeron 45 ml de solución de sacarosa a 0,5 g/ml.

Los resultados (Fig. 12) indican que la producción de taumatina es también del orden de 100 mg/l, con la ventaja adicional de una producción más temprana y el uso de una fuente de nitrógeno más económica. Por lo tanto, el promotor del glutamato deshidrogenasa de Aspergillus niger, var. awamori se revela más eficiente que el promotor de la proteína B2 de 30 Acremonium chrysogenum.

C.2.3. Cepa TGP-3

Esta cepa es un derivado de la cepa Lpr66 obtenido por transformación de LpR66 con el cassette de expresión

:-.::



pGPThbl. Este cassette de expresión contiene el gen sintético de la taumatina II bajo el control del promotor del gen gpd de <u>Aspergillus niger, var.</u>

<u>awamori</u>. En matraces de Erlermeyer con medio MDFA esta cepa secreta 9-10 mg. taumatina/litro.

C.2.4. Transformantes dobles

Las cepas TB2b1-44 y TGP-3 fueron re-transformadas con 10 el plásmido de expresión pGD71, el cual contiene el gen de la taumatina bajo el control del promotor del glutamato deshidrogenasa de A. Awamori y un gen de resistencia a la higromicina B como marcador de selección para experimentos de transformación. Se 15 analizaron en experimentos realizados en matraz de Erlermeyer un conjunto de diferentes transformantes (ver Tabla 3). Se vió que la retransformación de la cepa TGP-3 no dió cepas con mejores produjctividades de taumatina. Sin embargo, la 20 re-transformacióbn de la TB2b1-44 dió cepas de producción mejorada cuando se cultivaron en matraces de Erlermeyer bajo las conditiones estándar anteriormente mencionadas.

25 <u>D: Purificación de la taumatina recombinante</u>

de la taumatina recombinante. En el primero el caldo de fermentación fue simplemente clarificado,

30 concentrado y diafiltrado, dando un extracto concentrado y limpio que se utilizó para experimentos de sensitivitad para asegurar el perfil dulce de la taumatina recombinante. El segundo procedimiento involucra un protocolo clásico de purificación, con el resultado final de la obtención de taumatina pura.

Se emplearon dos procedimientos para la purificación



<u>Tabla 3</u>: Producción de taumatina en matraz de Erlermeyer por cepas retransformadas crecidas en medio MDFA durante 96 h. Cuantificación por ELISA. Todas las cepas se retransformaron utilizando la resistencia a la higromicina B como marcador de selección.

Transformante Producción (mq/l) 10 TGP3 TGP3-GD1 2.08 TGP3-GD2 0.40 TGP3 TGP3 9.44 TGP3-GD3 8.25 TGP3 TGP3-GD4 TGP3 15 0.40 TGP3-GD5 TGP3 TGP3-GD6 9.71 3.84 TB2b1-44 TB2b1-44-GD1 TB2b1-44 TB2b1-44-GD2 0.00 TB2b1-44-GD3 9.85 TB2b1-44 20 TB2b1-44-GD4 TB2b1-44 11.10 11.82 TB2b1-44 TB2b1-44-GD5 TB2b1-44 TB2b1-44-GD6 10.75 TB2b1-44 TB2b1-44-GD7 10.52 TB2b1-44-GD8 8.09 TB2b1-44 25 TB2b1-44 TB2b1-44-GD9 7.13

D.1. Clarificación, concentración y diafiltración de los caldos defermentación

La biomasa se eliminó mediante filtración a través de papel de filtro. El filtrado se recogió en un matraz Kitasatos que estaba sumergido en hielo.El caldo clarificado se centrifugó a 6000 rpm durante 15 minutos a 4°C.

30



El caldo de fermentación clarificado se concentró mediante ultrafiltración con un Sistema de Filtración Tangencial ProFluxTM M12. La configuración del sistema fue: unidad base, sensor de nivel, depósito de 2,5 l, serpentín de refrigeración, transductores de presión de salida y entrada, bomba secundaria y un cartucho en espiral S1Y3 (3.000 Daltons de tamaño de exclusión).

10

35

El sistema se operó como sigue:(1)Calibración de sensores de presión. (2) Ajuste de los valores de consigna de alarma: Límite inferior (entrada) 3,0 Bars, límite superior (entrada) 3,5 Bars, diferencia de presión (entrada-salida) 0,3 Bars. (3) Lavado del 15 sistema y del cartucho con agua desionizada. (4) Llenado del depósito con la solución a procesar; dicha solución se mantiene a 8-10°C recirculando agua fría (HAAKE, Criostato DC1-K20) por el serpentín de refrigeración. (5) Ajuste del sensor de nivel al 20 volumen de concentración deseado (1/4 - 1/5 del volumen inicial). (6) Operar con la bomba de recirculación al 75%. (7) Ajuste de la válvula reguladora de presión hasta obtener 3,0 Bar de presión de entrada. Si era necesario, se reducía la presión 25 durante el procesamiento.

Una vez el caldo de fermentación se concentró al volumen deseado, la solución se diafiltró con el objetivo de eliminar los solutos de bajo peso molecular (Sales, azúcares, etc.).

La configuración del sistema permite operar en modo de "diafiltración por bombeo con parada automática de seguridad". La bomba secundaria, accionada por el



sensor de nivel transfiere la solución de dialización (5 volúmenes de agua desionizada) al depósito, manteniendo el volumen constante. Una vez agotada la solución de diafiltración la bomba secundaria y el sistema principal se paran automáticamente.

La solución diafiltrada se recogió del sistema, se esterilizó por filtración (Stericup, 0.22 μm, Millipore) y se almacenó a 4°C.

5

10

25

35

D.2. Purificación de la taumatina recombinante hasta homogeneidad

La taumatina recombinante se purificó hasta homogeneidad usando un procedimiento de purificación 15 en cuatro pasos que se detalla en la Tabla 4. El punto de partida de este protocolo de purificación que aquí se describe son 500 ml de caldo de fermentación, obtenidos del crecimiento de la cepa TGDTh-4, con una concentración de taumatina presente de 50 mg/l. 20

Las proteínas de este caldo se precipitaron con sulfato amónico (rango 20-50%). El precipitado fue entonces resuspendido en un tampón fosfato 25 mM, pH 7.0.

Esta mezcla se pasó a través de una columna Sephadex G-25 (para eliminar sales) y se eluyó con el mismo tampón. Finalmente la muestra se cargó en una columna CM-Sepharose a un flujo de 0,5 ml/minuto. La columna 30 se lavó con tampón fosfato 25 mM, pH 7.con el objetivo de eliminar las proteínas en la fracción de flujo circulante. La taumatina se eluyó con un gradiente lineal de NaCl (0-400 mM). La taumatina que se eluye de esta columna es prácticamente pura como se detecta



por tinción con "Coomassie Blue".

Tabla 4: Purificación de taumatina del caldo de fermentación del crecimiento de la cepa TGDTh-4 en

5 medio MDFA

	MUESTRA	VOLUMEN	CONC.	TOTAL	REND
		(ml)	(mg/l)	(mg)	(용)
10	Caldo	500	50	25	100.0
	sulfato amónico	11	1745	19.2	76.8
	Sephadex G-25	30	596	17.9	71.6
	CM-Sepharose	24	704	16.9	67.6



LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID 1. Secuencia de nucleótidos de 2570 pb del fragmento de DNA presente en el plásmido pBSGh, así como el extremo 5´ del plásmido pB1.7, que contiene el 5 gen gdhA de A. awamori. Los numeros de la derecha indican el número de la secuencia. La región promotora del gen gdhA de A. awamori precede al codón de iniciación ATG en la posición 741 en la secuencia. El inicio de la transcripción se encuentra en la posión T 10 de -86 con respecto a la tripleta de iniciación de la traducción (posición 655 en la secuencia). La parte del gen que codifica a la proteína empieza en la posición 741. Los números debajo de los aminoácidos indican su numeración. Hay un total de 460 15 aminoácidos. El símbolo estrella (*) después del último aminoácido indica el final de proteína. Se describen también los dos exones que contiene.

20	TCTAGATTGC	GACGGCGTAT	TGCTTATCCT	TAGTAGGACT	CCCTAATGGA	TTCCGAGCAA	60
	GAAAAGACTG	TTTGGCGTGT	ACCAATGGCT	CATAGTACCA	GCAAGAGAAG	AATTTTCTCT	120
	CTCGCTTCGA	GAAAGCAATC	ТААААААА	CCTATCCTAC	CCTACCCTAC	CCTAATACTT	180
	CCATTGCCAC	CCGATTCCTC	CCGATAGTAG	AGCGGGCGAC	TGCCATTTGG	CGGGCGGCC	240
	AGCGGATTCC	CGCCGATAGA	TAACGGGCAG	ATTCTGTGAC	CTCAAACTAT	CGACTAACAG	300
25	CCCGAACTTC	GGCGGCCACC	GCCAAACCCG	CCCCGGAAGC	CGGCCTCATT	TGCCGTTTGG	360
	GCGTGCCAGG	AAATGCCGCC	TGCAGCGGAG	ACTCCCTAGT	GTGGTCTGTG	TTGCCTGTGT	420
	CGTCTGTGTA	GTATACTAGT	TACTAGTCTA	CTACTGTACA	GTGGATGGCC	TGAGGGGGG	480
	ACTITATGTC	CGACTCCGGC	TGTTCTCCTC	CCTCTATCCA	CTCTACCCTC	TTCCCTCTCT	540
	TCTGTCTTTC	TCCCCGCTCT	CGCCCTCCC	CTCCTCGAAA	ACATAAATCG	GCCTTTCCCC	600
30	CTCGCCATCT	TCTTCTTCTT	CTCCCTCTCC	TTTCTCTTTC	TTCTTCAGAC	TACTTCTCTT	660
	TCTTTCATCT	TTTCTCTATA	TTCCTGTTTT	CCTAGATACC	CCAGTTAAAA	AAGTTCTCTC	720
	AATCAATCCT	CCCCTTCAGA	ATG TCT AAG	C CTT CCT C	AC GAG CCC (GAG TTC	770
			Met Ser Ası	n Leu Pro H	is Glu Pro (Glu Phe	

5

1

10



	GAG CAG GCC TAC AAG GGTATGTTCC ATTGCCCCTC CGAAATTGAT GATGGAAAAA	825
	Glu Gln Ala Tyr Lys	
	15	
5	AAATTCTAAC AACATCCTCT TACA GAG CTT GCC TCG ACC CTT GAG AAC TCC	876
	Glu Leu Ala Ser Thr Leu Glu Asn Ser	
	20	
	·	
	ACC CTC TTC CAG AAG AAC CCC GAA TAC CGC AAG GCC CTT GCT GTC GTC	924
10	Thr Leu Phe Gln Lys Asn Pro Glu Tyr Arg Lys Ala Leu Ala Val Val	
	25 30 35 40	
	TCC GTC CCC GAG CGT GTC ATC CAG TTC CGT GTC GTC TGG GAG GAT GAT	972
	Ser Val Pro Glu Arg Val Ile Gln Phe Arg Val Val Trp Glu Asp Asp	
15	45 50 55	
	GCC GGC AAC GTC CAG GTC AAC CGC GGT TTC CGT GTC CAG TTC AAC AGC	1020
	Ala Gly Asn Val Gln Val Asn Arg Gly Phe Arg Val Gln Phe Asn Ser	
	60 65 70	
20		
	GCC CTC GGT CCC TAC AAG GGT GGT CTT CGT TTC CAC CCC TCC GTC AAC	1068
	Ala Leu Gly Pro Tyr Lys Gly Gly Leu Arg Phe His Pro Ser Val Asn	
	75 80 85	
25	TTG TCC ATC CTC AAG TTC CTT GGT TTC GAG CAG ATC TTC AAG AAT GCT	1116
	Leu Ser Ile Leu Lys Phe Leu Gly Phe Glu Gln Ile Phe Lys Asn Ala	
	90 95 100	
	CTC ACT GGC CTG AAC ATG GGT GGT GGT AAG GGT GGT TCC GAC TTC GAC	1164
30	Leu Thr Gly Leu Asn Met Gly Gly Gly Lys Gly Gly Ser Asp Phe Asp	
	105 110 115 120	
	CCC AAG GGC AAG TCC GAC AAC GAG ATC CGT CGC TTC TGT GTT TCC TTC	1212
_	Pro Lys Gly Lys Ser Asp Asn Glu Ile Arg Arg Phe Cys Val Ser Phe	
35	125 130 135	



	ATG ACC	GAG	CTC	TGC	AAG	CAC	ATC	GGT	GCC	GAC	ACT	GAT	GTT	CCC	GCT	1260
	Met Thr	Glu	Leu	Cys	Lys	His	Ile	Gly	Ala	Asp	Thr	Asp	Val	Pro	Ala	
			140					145					150			
5																
	GGT GAC	ATC	GGT	GTC	ACC	GGT	CGT	GAG	GTC	GGT	TTC	CTC	TTC	GGC	CAG	1308
	Gly Asp	Ile	Gly	Val	Thr	Gly	Arg	Glu	Val	Gly	Phe	Leu	Phe	Gly	Gln	
		155					160					165				
																1256
10	TAC CGC															1356
	Tyr Arg	Lys	Ile	Arg	Asn		Trp	Glu	GLY	Val		Thr	GIÀ	гуs	GIY	
	170					175					180					
	GGC AGC	TCC	CCT	CCT	יווירר	ריזיר	ልጥሮ	ccc	CCT	GNG	ccc	ACC.	GGT	TAC	GGT	1404
15	Gly Ser															
10	185	p	Cly	Cly	190	Deu	110	9		195			,	-,-	200	
																÷
	GTT GTC	TAC	GTA'	rgtc	AAT '	rccT(CTTC	TT A	rgat"	ratc:	r ate	GTAT	AACA			1453
	Val Val	Tyr				,										
20																
	GCGACTA	ACG	CGTA	ACAG	TAC	GTC	GAG	CAC	ATG	ATT	GCT	CAC	GCC	ACC	AAC	1504
					Tyr	Val	Glu	His	Met	Ile	Ala	His	Ala	Thr	Asn	
						205					210					
25	GGC CAG															1552
	Gly Gln	Glu	Ser	Phe	_	Gly	Lys	Arg	Val	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser		
	215				220					225					230	
											~~~	~=~	666	com	mac	1600
20	AAC GTT															1600
30	Asn Val	Ala	GIN		Ala	AIa	Leu	rys	240	me	GIU	Leu	GLY	245		
				235					240					233		
	cmc cmc	TCC	CTC.	<b>ACC</b>	GAC	ACG	CAG	GGC	TCC	CTC	ATC	ATC	AAC	GGC	GAG	1648
	(STC) (STC)															
	GTC GTC							Glv	Ser	Leu	Ile	Ile	Asn	Gly	Glu	
35	Val Val							Gly 255	Ser	Leu	Ile	Ile	Asn 260	Gly	Glu	



	CCT	ACC	ጥጥር	NCC.	ccc	CNC	CNC	አጥ <b>ር</b>	CNC	CTT C	አጥር	CCT	CAC	ACC	ממכ	СТС	1696
																	1000
	GIY	Ser		1111	PIO	GIU	GIU		GIU	Leu	TTE	Αια		Thr	гуз	vai	
5			265					270					275				
J	CDC	ccc	7 7 C	CDC	om c	ccc	n.c.c	n m C	CITIC	CCM	CCM	CCIII	000	mmc.	n.c.c	CDC	1744
														TTC			1/44
	GIU		Asn	GIU	Leu	Ата		11e	vai	стА	Ala		Pro	Phe	ser	Asp	
		280					285					290					
1.0	cca	220		mma		ma 0	1 mm		com	000	000	000	maa	com	an c	CTC.	1702
10														GTT			1792
		Asn	Lys	Phe	Lys	Ĭ.	Пе	Ala	GIY	Ата		Pro	Trp	Val	HIS		
	295					300					305					310	
																	1040
1.5														GAA			1840
15	Gly	Lys	Val	Asp		Ala	Leu	Pro	Ser		Thr	Gln	Asn	Glu		Ser	
					315					320					325		
														TTC			1888
0.0	Gly	Glu	Glu		Gln	Val	Leu	Ile		Ala	Gly	Cys	Lys	Phe	Ile	Ala	
20				330					335					340			
														ACC			1936
	Glu	Gly	Ser	Asn	Met	Gly	Cys		Gln	Glu	Ala	Ile	Asp	Thr	Phe	Glu	
0.5			345					350					355				
25																	
	GCC	CAC	CGT	ACC	GCC	AAC	GCT	GGC	GCG	GCT	GCC	ATC	TGG	TAC	GCC	ccc	1984
	Ala		Arg	Thr	Ala	Asn	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	Ile	Trp	Tyr	Ala	Pro	
		360					365					370					
																	_
30	GGT	AAG	GCC	GCC	AAC	GCC	GGT	GGT	GTC	GCT	GTC	TCC	GGT	CTG	GAG	ATG	2032
	Gly	Lys	Ala	Ala	Asn	Ala	Gly	Gly	Val	Ala	Val	Ser	Gly	Leu	Glu	Met	
	375					380					385					390	



	GCT CAG AAC TCT GCC CGC CTC AGC TGG ACT TCT GAG GAG GTT GAT GCC	2080
	Ala Gln Asn Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ser Glu Glu Val Asp Ala	
	395 400 405	
5	CGT CTT AAG GAC ATC ATG CGC GAC TGC TTC AAG AAC GGT CTT GAG ACT	2128
	Arg Leu Lys Asp Ile Met Arg Asp Cys Phe Lys Asn Gly Leu Glu Thr	
	410 415 420	
	GCT CAG GAG TAC GCC ACC CCC GCT GAG GGT GTC CTG CCT TCC CTG GTG	2176
10	Ala Gln Glu Tyr Ala Thr Pro Ala Glu Gly Val Leu Pro Ser Leu Val	
	425 430 435	
		2224
	ACC GGA TCC AAC ATT GCC GGT TTC ACC AAG GTG GCT GCC GCC ATG AAG	2224
1 5	Thr Gly Ser Asn Ile Ala Gly Phe Thr Lys Val Ala Ala Ala Met Lys	
15	440 445 450	
	GAC CAG GGT GAC TGG TGAAATGCGGA AAGCCGCAAA CCCCCGCGGC	2272
	Asp Gln Gly Asp Trp Trp	
	455 460	
20		
	TTATGTCATG ACGATTATGT AGTTTGATGT TCCCTTTCAG CGCGGATGGA TAGAGGCGCC	2332
	GGTGTTTTCT TGCTAGTTTA GATGGATGCA TAATGATATC CTTTTCTTAA TCCTCAAATT	2392
	CTTGTAATTT GTTGTATCAA TAGTAGATAA TACAACTGTA GTCAACTACC CTTGCATCTT	2452
	CACTATTTGC AGATGCATTC ATCTCTATTC CGAGCACATG CACAAACCCA TGGGACCGCA	2512
25	GTTCACTAGT ACTTAGCCTG TTATCTTCCC TCTATCGCAT CTTAAACAAC TATCTAGA	2570
	•	



SEQ ID 2. Secuencia de aminoácidos de la proteína glutamato deshidrogenasa A (gdhA) Aspergillus niger, var. awamori deducida de la secuencia de nucleótidos en SEQ ID 1.

5

Met Ser Asn Leu Pro His Glu Pro Glu Phe Glu Gln Ala Tyr Lys Glu

1 5 10 15

10 Leu Ala Ser Thr Leu Glu Asn Ser Thr Leu Phe Gln Lys Asn Pro Glu
20 25 30

Tyr Arg Lys Ala Leu Ala Val Val Ser Val Pro Glu Arg Val Ile Gln 35 40 45

15

Phe Arg Val Val Trp Glu Asp Asp Ala Gly Asn Val Gln Val Asn Arg
50 55 60

Gly Phe Arg Val Gln Phe Asn Ser Ala Leu Gly Pro Tyr Lys Gly Gly

20 65 70 75 80

Leu Arg Phe His Pro Ser Val Asn Leu Ser Ile Leu Lys Phe Leu Gly 85 90 95

25 Phe Glu Gln Ile Phe Lys Asn Ala Leu Thr Gly Leu Asn Met Gly Gly
100 105 110

Gly Lys Gly Gly Ser Asp Phe Asp Pro Lys Gly Lys Ser Asp Asn Glu 115 120 125

30

Ile Arg Arg Phe Cys Val Ser Phe Met Thr Glu Leu Cys Lys His Ile 130 135 140

Gly Ala Asp Thr Asp Val Pro Ala Gly Asp Ile Gly Val Thr Gly Arg

150 155 160



	Glu Val	Gly		Leu 165	Phe	Gly	Gln	Tyr	Arg 170	Lys	Ile	Arg	Asn	Gln 175	Trp
5	Glu Gly		Leu 180	Thr	Gly	Lys	Gly	Gly 185	Ser	Trp	Gly	Gly	Ser 190	Leu	Ile
10	Arg Pro	Glu 195	Ala	Thr	Gly	туг	Gly 200	Val	Val	Tyr	Tyr	Val 205	Glu	His	Met
10	Ile Ala 210	His	Ala	Thr	Asn	Gly 215	Gln	Glu	Ser	Phe	Lys 220	Gly	Lys	Arg	Val
15	Ala Ile 225	Ser	Gly	Ser	Gly 230	Asn	Val	Ala	Gln	Туг 235	Ala	Ala	Leu	Lys	Val 240
	Ile Glu	Leu	Gly	Gly 245	Ser	Val	Val	Ser	Leu 250	Ser	Asp	Thr	Gln	Gly 255	Ser
20	Leu Ile	Ile	Asn 260	Gly	Glu	Gly	Ser	Phe 265	Thr	Pro	Glu	Glu	Ile 270	Glu	Leu
0.5	Ile Ala	Gln 275	Thr	Lys	Val	Glu	Arg 280	Asn	Glu	Leu	Ala	Ser 285	Ile	Val	Gly
25	Ala Ala 290	Pro	Phe	Ser	Asp	Ala 295	Asn	Lys	Phe	Lys	Туг 300	Ile	Ala	Gly	Ala
30	Arg Pro	Trp	Val	His	Val 310	Gly	Lys	Val	Asp	Val 315	Ala	Leu		Ser	Ala 320
	Thr Gln	Asn	Glu	<b>Val</b> 325	Ser	Gly	Glu	Glu	Ala	Gln	Val	Leu			Ala



	Gly	Cys	Lys	Phe 340	Ile	Ala	Glu	Gly	Ser 345	Asn	Met	Gly	Cys	Thr 350	Gln	Glu
5	Ala	Ile	Asp 355	Thr	Phe	Glu	Ala	His 360	Arg	Thr	Ala	Asn	Ala 365	Gly	Ala	Ala
	Ala	Ile 370	Trp	Tyr	Ala	Pro	Gly 375	Lys	Ala	Ala	Asn	Ala 380	Gly	Gly	Val	Ala
10	Val 385	Ser	Gly	Leu	Glu	Met 390	Ala	Gln	Asn	Ser	Ala 395	Arg	Leu	Ser	Trp	Thr
15	Ser	Glu	Glu	Val	Asp 405	Ala	Arg	Leu	Lys	Asp 410	Ile	Met	Arg	Asp	Cys 415	Phe
	Lys	Asn	Gly	Leu 420	Glu	Thr	Ala	Gln	Glu 425	_	Ala	Thr	Pro	Ala 430	Glu	Gly
20	Val	Leu	Pro 435	Ser	Leu	Val	Thr	Gly 440	Ser	Asn	Ile	Ala	Gly 445	Phe	Thr	Lys
	Val	Ala	Ala	Ala	Met	Lys	Asp	Gln	Gly	Asp	Trp	Trp				







#### SEQUENCE LISTING

(1	) GENERAL	INFORMATION:
----	-----------	--------------

- (i) APPLICANT:
  - (A) NAME: URQUIMA, S.A.
  - (B) STREET: Dega Bahi, 59-67
  - (C) CITY: Barcelona
  - (D) STATE: Barcelona
  - (E) COUNTRY: Spain
  - (F) POSTAL CODE (ZIP): 08026
  - (G) TELEPHONE: 343-3471511
  - (H) TELEFAX: 347-4560639
  - (I) TELEX: 52.963URIAC E
- (ii) TITLE OF INVENTION: Promotor and constructions for expression of recombinant proteins in filamentous fungi (Promotor y construcciones para la expresión de proteínas recombinantes en hongos filamentosos)
- (iii) NUMBER OF SEQUENCES: 2
- (iv) COMPUTER READABLE FORM:
  - (A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
  - (B) COMPUTER: IBM PC compatible
  - (C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
  - (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPO)
- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 1:
  - (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
    - (A) LENGTH: 2570 base pairs
    - (B) TYPE: nucleic acid
    - (C) STRANDEDNESS: double
    - (D) TOPOLOGY: linear
  - (ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)
  - (iii) HYPOTHETICAL: NO
  - (iv) ANTI-SENSE: NO
  - (vi) ORIGINAL SOURCE:
    - (A) ORGANISM: Aspergillus awamori
    - (B) STRAIN: ATCC 22342
  - (ix) FEATURE:
    - (A) NAME/KEY: intron
    - (B) LOCATION: 785..850
  - (ix) FEATURE:
    - (A) NAME/KEY: intron
    - (B) LOCATION: 1414..1471
  - (ix) FEATURE:
    - (A) NAME/KEY: CDS
    - (B) LOCATION: join (741..785, 850..1413, 1472..2242)



### (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 1:

TCTAGATTGC GACGCCGTAT TGCTTATCCT TAGTAGGACT CCCTAATGGA TTCCGAGCAA	60
GAAAAGACTG TTTGGCGTGT ACCAATGGCT CATAGTACCA GCAAGAGAAG AATTTTCTCT	120
CTCGCTTCGA GAAAGCAATC AAAAAAAAT CCTATCCTAC CCTACCCTAC	180
CCATTGCCAC CCGATTCCTC CCGATAGTAG AGCGGGCGAC TGCCATTTGG CGGGCGGCC	240
AGCGGATTCC CGCCGATAGA TAACGGGCAG ATTCTGTGAC CTCAAACTAT CGACTAACAG	300
CCCGAACTTC GGCGGCCACC GCCAAACCCG CCCCGGAAGC CGGCCTCATT TGCCGTTTGG	360
GCGTGCCAGG AAATGCCGCC TGCAGCGGAG ACTCCCTAGT GTGGTCTGTG TTGCCTGTGT	420
CGTCTGTGTA GTATACTAGT TACTAGTCTA CTACTGTACA GTGGATGGCC TGAGGGGGGG	480
ACTITATETC CGACTCCGGC TETTCTCCTC CCTCTATCCA CTCTACCCTC TTCCCTCTCT	540
TCTGTCTTC TCCCCGCTCT CGCCCCTCCC CTCCTCGAAA ACATAAATCG GCCTTTCCCC	600
CTCGCCATCT TCTTCTTCTT CTCCCTCTCC TTTCTCTTTC TTCTTC	660
TCTTTCATCT TTTCTCTATA TTCCTGTTTT CCTAGATACC CCAGTTAAAA AAGTTCTCTC	720
AATCAATCCT CCCCTTCAGA ATG TCT AAC CTT CCT CAC GAG CCC GAG TTC  Met Ser Asn Leu Pro His Glu Pro Glu Phe  1 5 10	770
GAG CAG GCC TAC AAG GGTATGTTCC ATTGCCCCTC CGAAATTGAT GATGGAAAAA Glu Gln Ala Tyr Lys 15	825
AAATTCTAAC AACATCCTCT TACA GAG CTT GCC TCG ACC CTT GAG AAC TCC Glu Leu Ala Ser Thr Leu Glu Asn Ser 20	876
ACC CTC TTC CAG AAG AAC CCC GAA TAC CGC AAG GCC CTT GCT GTC GTC Thr Leu Phe Gln Lys Asn Pro Glu Tyr Arg Lys Ala Leu Ala Val Val 25 30 35 40	924
TCC GTC CCC GAG CGT GTC ATC CAG TTC CGT GTC GTC TGG GAG GAT GAT Ser Val Pro Glu Arg Val Ile Gln Phe Arg Val Val Trp Glu Asp Asp 45 50 55	972
GCC GGC AAC GTC CAG GTC AAC CGC GGT TTC CGT GTC CAG TTC AAC AGC Ala Gly Asn Val Gln Val Asn Arg Gly Phe Arg Val Gln Phe Asn Ser 60 65 70	1020
GCC CTC GGT CCC TAC AAG GGT GGT CTT CGT TTC CAC CCC TCC GTC AAC Ala Leu Gly Pro Tyr Lys Gly Gly Leu Arg Phe His Pro Ser Val Asn 75 80 85	1068
TTG TCC ATC CTC AAG TTC CTT GGT TTC GAG CAG ATC TTC AAG AAT GCT Leu Ser Ile Leu Lys Phe Leu Gly Phe Glu Gln Ile Phe Lys Asn Ala 90 95 100	1116
CTC ACT GGC CTG AAC ATG GGT GGT GGT AAG GGT GGT TCC GAC TTC GAC Leu Thr Gly Leu Asn Met Gly Gly Gly Lys Gly Gly Ser Asp Phe Asp 105 110 115 120	1164
CCC AAG GGC AAG TCC GAC AAC GAG ATC CGT CGC TTC TGT GTT TCC TTC Pro Lys Gly Lys Ser Asp Asn Glu Ile Arg Arg Phe Cys Val Ser Phe 125 130 135	1212
ATG ACC GAG CTC TGC AAG CAC ATC GGT GCC GAC ACT GAT GTT CCC GCT Met Thr Glu Leu Cys Lys His Ile Gly Ala Asp Thr Asp Val Pro Ala 140 145 150	1260



GOT GAC ATC GGT STO ACC GGT COT DAG GTC SWALL THE THE GIV GIR Bly Asp Tie Gly Wal Thr Gly Asp Giu Wal Bly Bhe Lei Bhe Giv Gin Bly Asp Tie Gly Wal Thr Gly Asp Giu Wal Bly Bhe Lei Bhe Giv Gin	1308
TAC CGC AAG ATC ISO AAC CAG ISG GAG GTT STT ITT ACC GGT AAG GGT Tyr Arg Lys Ile Arg Asn Gin Trp Glu Gly Val Leu Thr Bly Lys Gly	1356
990 AGO TGG GGT SGT TGG CTG ACC CGT GAG GGC ACC GGT TAC GGT Siy Ser Trp Gly Gly Ser Leu lle Arg Pro 311 Ale Thr Gly Tyr Gly 185 190 186	1404
STT GTC TAC GTATGTCAAT TCCTCTTCTT ATGATTATCT ATGTATAACA Val Val Tyr	1453
GOGACTAACG CGTAACAG TAC GTC GAG CAC ATG ATT GOT CAC GCC ACC AAC Tyr Vai Glu His Met Ile Ala His Ala Thr Asn 1966 210	1504
GGC CAG GAG TOO TTO AAG GGC AAG CGC GTT GCC ATC TCC GGT TCC GGT Gly Gln Glu Ser Phe Lys Gly Lys Ard Vai Ala Ile Ser Gly Ser Gly 115 220	1552
AAC GTT GCC CAS TAC GCC GCC CTC AAG GTC ATT GAG CTC GGC GGT TCC Asn Val Ala Gin Tyr Ala Ala Leu Lys Val Ile Glu Leu Gly Gly Ser 138 245	1600
GTC GTC TCC CTG AGC GAC ACG CAG GGC TCC CTC ATC ATC AAC GGC GAG Val Val Ser Leu Ser Asp Thr Gla Gly Ser Leu lie Ile Asa Gly Glu 260	1648
GGT AGC TTC ACC CCC GAG GAG ATC GAG CTC ATC GCT CAG ACC AAG GTC Gly Ser Phe Thr Pro Glu Glu Ile Glu Leu Ile Ala Gln Thr Lys Val	1696
265 270  ARG CGC ARC GRG DTC GCC AGC ATC GTC GGT GCT GCC TTC AGC GAC Glu Arg Asn Glu Leu Ala Ser lle Val Gly Ala Ala Pro Phe Ser Asp 190 295	1744
300 AAC AAG TOO AAG TAC ATT GOT GGT GGC CGC CCC TGG GTT CAC GTC Ala Asn Lys Phe Lys Tyr Ile Ala Gly Ala Asn Pro Trp Val His Val 195	1792
3GC AAG GTC GAG 3TC GCT CTC CCC TCC GCT ACC CAG AAC GAA GTT TCC Gly Lys Val Asp Val Ala Leu Pro Ser Ala Thr Gln Ash Glu Val Ser 315	1940
GGC GAG GAG BOW TAG GTO CTC ATC AAC GCT GGC TGC AAG TTC ATC GCC Gly Glu Glu Ala Gln Val Leu Ile Aan Ala Gly Cya Lys Phe Ile Ala 335	1988
TAG GGT TCC AAC ATG GGT TGC ACC CAG GAG GCC ATC GAC ACC TTC GAG Glu Gly Ser Ash Met Gly Cys Thr Glo Glu Als Ile Asp Thr Phe Glu	1936
345 309 300 CAC GOT ACC GOC AAC GOT GGC GCC GCC ATC TGG TAC GCC CCC Ala His Arg The Ala Ash Ala Giy Ala Ala Ala fie Tep Tyr Ala Pro 360 360	1984
UGT AAG GCC 300 AAC GCC GGT GGT GTC GCT GTC TCC GGT CTG GAG ATG Gly Lys Ala Ala Asn Ala Gly Gly Val Ala Val Ser Gly Leu Glu Met 175	2033
ACT CAG AAC IIT GOO 350 STO AGG IGG ACT TOT GAG GAG GTT GAT GOO Ala Gin Ash For Ala And Leu Ser Tip Thr Fer Giu Giu Val Asp Ala Ala Gin Ash For Ala And Leu Ser Tip Thr Jer Giu Giu Val Asp Ala	2080
THE COST AAU DAI ATO ATE ONE TAKE THE THE AAG AAC NOT COST GAG ACT ARE LEED LEED LIE MET ARE ASP MYS PAR LYS ASP GLY LEED THE LEED LEED LEED LEED LEED LEED LEED LE	0113

THIS PAGE BLANK (USPTO)



58	
GCT CAG GAG TAC GCC ACC CCC GCT GAG GGT GTC CTG CCT TCC CTG GTG Ala Gln Glu Tyr Ala Thr Pro Ala Glu Gly Val Leu Pro Ser Leu Val 425 430 435	2176
ACC GGA TCC AAC ATT GCC GGT TTC ACC AAG GTG GCT GCC GCC ATG AAG Thr Gly Ser Asn Ile Ala Gly Phe Thr Lys Val Ala Ala Ala Met Lys 440 445	2224
GAC CAG GGT GAC TGG TGAAATGCGGA AAGCCGCAAA CCCCCGCGGC Asp Gln Gly Asp Trp 455 460	2272
TTATGTCATG ACGATTATGT AGTTTGATGT TCCCTTTCAG CGCGGATGGA TAGAGGCGCC	2332
GGTGTTTTCT TGCTAGTTTA GATGGATGCA TAATGATATC CTTTTCTTAA TCCTCAAATT	2392
CTTGTAATTT GTTGTATCAA TAGTAGATAA TACAACTGTA GTCAACTACC CTTGCATCTT	2452
CACTATTTGC AGATGCATTC ATCTCTATTC CGAGCACATG CACAAACCCA TGGGACCGCA	2512
GTTCACTAGT ACTTAGCCTG TTATCTTCCC TCTATCGCAT CTTAAACAAC TATCTAGA	<b>25</b> 70
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 2:	
<ul><li>(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:</li><li>(A) LENGTH: 460 amino acids</li><li>(B) TYPE: amino acid</li><li>(D) TOPOLOGY: linear</li></ul>	
(ii) MOLECULE TYPE: protein (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 2:	
Met Ser Asn Leu Pro His Glu Pro Glu Phe Glu Gln Ala	
Leu Ala Ser Thr Leu Glu Asn Ser Thr Leu Phe Gln Lys 20 25	Asn Pro Glu 30
Tyr Arg Lys Ala Leu Ala Val Val Ser Val Pro Glu Arg 45	Val Ile Gln
Phe Arg Val Val Trp Glu Asp Asp Ala Gly Asn Val Gln 50 55 60	Val Asn Arg
Gly Phe Arg Val Gln Phe Asn Ser Ala Leu Gly Pro Tyr	Lys Gly Gly 80

Gly Phe Arg Val Gln Phe Asn Ser Ala Leu Gly Pro Tyr Lys Gly Gly 80 65 70 75 80

Leu Arg Phe His Pro Ser Val Asn Leu Ser Ile Leu Lys Phe Leu Gly 90 95

Phe Glu Gln Ile Phe Lys Asn Ala Leu Thr Gly Leu Asn Met Gly Gly 100 100 100 100

Gly Lys Gly Gly Ser Asp Phe Asp Pro Lys Gly Lys Ser Asp Asn Glu 115

Ile Arg Arg Phe Cys Val Ser Phe Met Thr Glu Leu Cys Lys His Ile

Gly Ala Asp Thr Asp Val Pro Ala Gly Asp Ile Gly Val Thr Gly Arg 145 150 155 160

THIS PAGE BLANK (USPTO)



Glu Val Gly Phe Leu Phe Gly Gln Tyr Arg Lys Ile Arg Asn Gln Trp 165 170 175

Glu Gly Val Leu Thr Gly Lys Gly Gly Ser Trp Gly Gly Ser Leu Ile 180 185 190

Arg Pro Glu Ala Thr Gly Tyr Gly Val Val Tyr Tyr Val Glu His Met

Ile Ala His Ala Thr Asn Gly Gln Glu Ser Phe Lys Gly Lys Arg Val

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Asn Val Ala Gln Tyr Ala Ala Leu Lys Val 225 230 235 240

Ile Glu Leu Gly Gly Ser Val Val Ser Leu Ser Asp Thr Gln Gly Ser

Leu Ile Ile Asn Gly Glu Gly Ser Phe Thr Pro Glu Glu Ile Glu Leu 260 265 270

Ile Ala Gln Thr Lys Val Glu Arg Asn Glu Leu Ala Ser Ile Val Gly

Ala Ala Pro Phe Ser Asp Ala Asn Lys Phe Lys Tyr Ile Ala Gly Ala 290 295 300

Arg Pro Trp Val His Val Gly Lys Val Asp Val Ala Leu Pro Ser Ala 305 310 315

Thr Gln Asn Glu Val Ser Gly Glu Glu Ala Gln Val Leu Ile Asn Ala 325 · 330 335

Gly Cys Lys Phe Ile Ala Glu Gly Ser Asn Met Gly Cys Thr Gln Glu 340 345

Ala Ile Asp Thr Phe Glu Ala His Arg Thr Ala Asn Ala Gly Ala Ala 355 360 365

Ala Ile Trp Tyr Ala Pro Gly Lys Ala Ala Asn Ala Gly Gly Val Ala 370 375 380

Val Ser Gly Leu Glu Met Ala Gln Asn Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr 385 390 395 400

Ser Glu Glu Val Asp Ala Arg Leu Lys Asp Ile Met Arg Asp Cys Phe 405 410 415

Lys Asn Gly Leu Glu Thr Ala Gln Glu Tyr Ala Thr Pro Ala Glu Gly

Val Leu Pro Ser Leu Val Thr Gly Ser Asn Ile Ala Gly Phe Thr Lys 435 440 445

Val Ala Ala Met Lys Asp Gln Gly Asp Trp Trp
450 455 460

THIS PAGE BLANK (USPTO)



#### REIVINDICACIONES

10

15

- 1. Promotor para la expresión de proteínas recombinantes en hongos filamentosos, que comprende una secuencia de nucleótidos -o su complementaria-seleccionada del grupo formado por: a) la secuencia numerada 1-740 en SEQ ID No. 1; b) una secuencia análoga a la definida en (a); y una secuencia que, bajo condiciones estrictas, se hibridiza a la definida en (a).
  - 2. Promotor según la reivindicación 1, donde la secuencia de nucleótidos es la secuencia numerada 1-740 en SEQ ID No. 1.
- 3. Promotor gdh del gen de la glutamato deshidrogenasa de <u>Aspergillus Niger</u>.
- 4. Promotor gdh del gen de la glutamato20 deshidrogenasa de <u>Aspergillus Niger var. Awamori</u>.
  - 5. Promotor gdhA del gen de la glutamato deshidrogenasa A de <u>Aspergillus Niger var. Awamori</u>.
- 6. Secuencia de ADN, purificada y aislada, que codifica la proteína glutamato deshidrogenasa y que comprende una secuencia de nucleótidos -o su complementaria- seleccionada del grupo formado por:

  a) la secuencia numerada 741-2245 en SEQ ID No. 1; b)

  una secuencia que es homóloga con la definida en (a);

y c) una secuencia que, bajo condiciones estrictas,

7. Secuencia de ADN según la reivindicación 6, donde la secuencia de nucleótidos seleccionada es la

se hibridiza a la definida in (a).

THIS PAGE BLANK (US.PTO)



numerada 741-2245 en SEQ ID No. 1.

10

- 8. Secuencia de ADN según la reivindicación 7, donde la proteína codificada es la glutamato deshidrogenasa de un hongo filamentoso.
  - 9. Secuencia de ADN según la reivindicación 8, donde la proteína codificada es la glutamato deshidrogenasa A de un hongo filamentoso.
  - 10. Proteína codificada por cualquiera de las secuencias de ADN definidas en la reivindicación 6.
- 11. Proteína codificada por cualquiera de las15 secuencias de ADN definidas en la reivindicación 7.
  - 12. Proteína codificada por cualquiera de las secuencias de ADN definidas en la reivindicación 8.
- 20 13. Proteína que tiene la secuencia de aminoácidos en SEQ ID No. 2.
  - 14. Construcción de ADN que comprende: a) un promotor definido in cualquiera de las reivindicaciones 1-5;
- b) una secuencia de ADN seleccionada del grupo formado por el gen de la glucoamilasa de <u>Aspergillus Niger var. Awamori</u>, el gen B2 de <u>Acremonium chrysogenum</u>, y cualquiera de las secuencias de ADN definidas en las reivindicaciones 6-9; c) una
- secuencia espaciadora que, a su vez, contiene una secuencia procesadora KEX2; y d) un gen codificador de la taumatina.
- 15. Construcción de ADN según la reivindicación 14, 35 donde el promotor es el definido en la reivindicación



: :

5.

- 16. Construcción de ADN según la reivindicación 15, donde la secuencia de ADN in (b) es el gen de la glucoamilasa de <u>Aspergillus Niger var. Awamori</u>.
- 17. Construcción de ADN según la reivindicación 15, donde la secuencia de ADN en (b) es el gen B2 de Acremonium chrysogenum.

10

- 18. Construcción de ADN según la reivindicación 15, donde la secuencia de ADN en (b) es la secuencia de ADN definida en la reivindicación 8.
- 19. Construcción de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 15-18, donde la secuencia de ADN en (d) es el gen sintético de la taumatina II proveniente del plásmido pThIX.
- 20 20. Cultivo de hongo filamentoso capaz de producir taumatina, que ha sido transformado con un plásmido que contiene una construcción definida en cualquiera de las reivindicaciones 14-19.
- 21. Cultivo según la reivindicación 20, donde el hongo filamentoso se selecciona del grupo formado por Aspergillus Niger y Aspergillus Niger var. Awamori.
- 22. Procedimiento de producción de taumatina que 30 comprende los siguientes pasos:
  - a) preparación de un plásmido de expresión que contiene una construcción de ADN definida en cualquiera de las reivindicaciones 14-19;

35



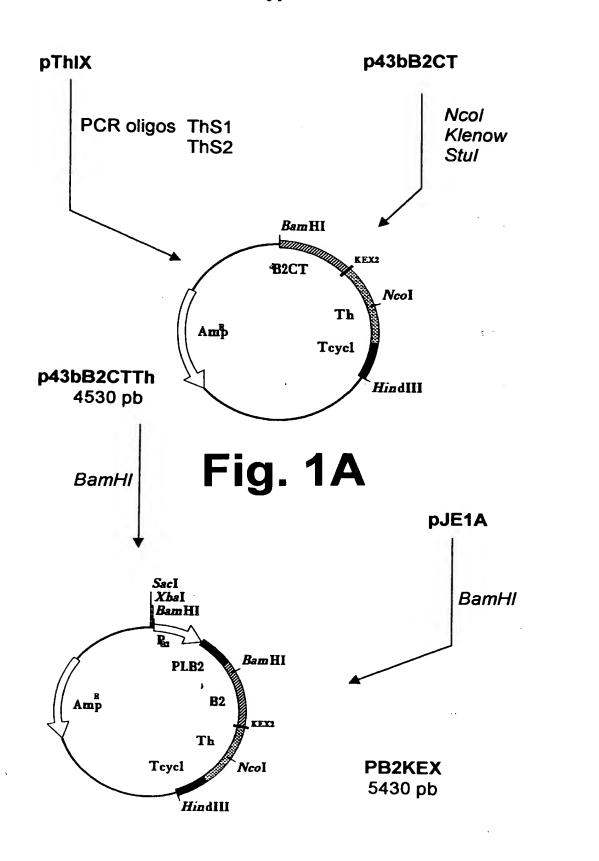
- b) transformación de una cepa de hongo filamentoso con dicho plásmido de expresión;
- c) cultivo de la cepa transformada, en condiciones nutritivas apropriadas para la producción de taumatina, bien intracelularmente, bien extracelularmente, o bien de ambas maneras simultáneamente;
- d) según el caso, separación y purificación de taumatina a partir del caldo de fermentación.

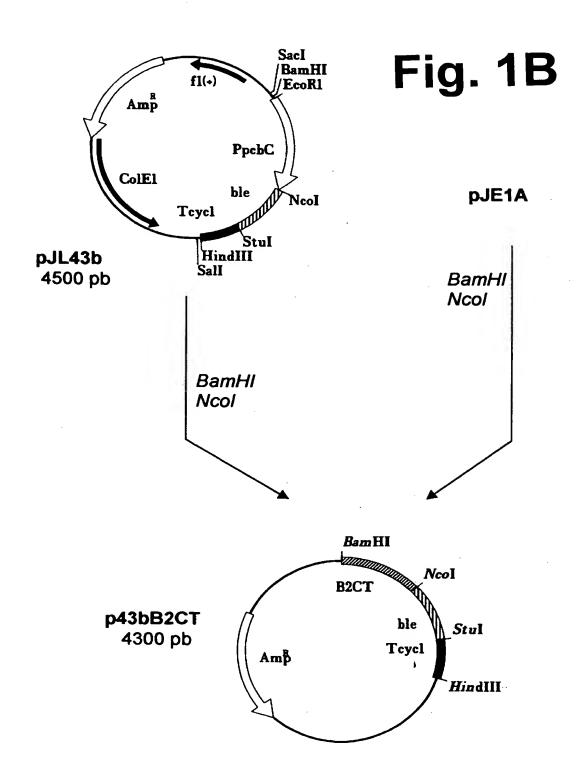
Madrid a,

iolega./ -ammwili≙R∆

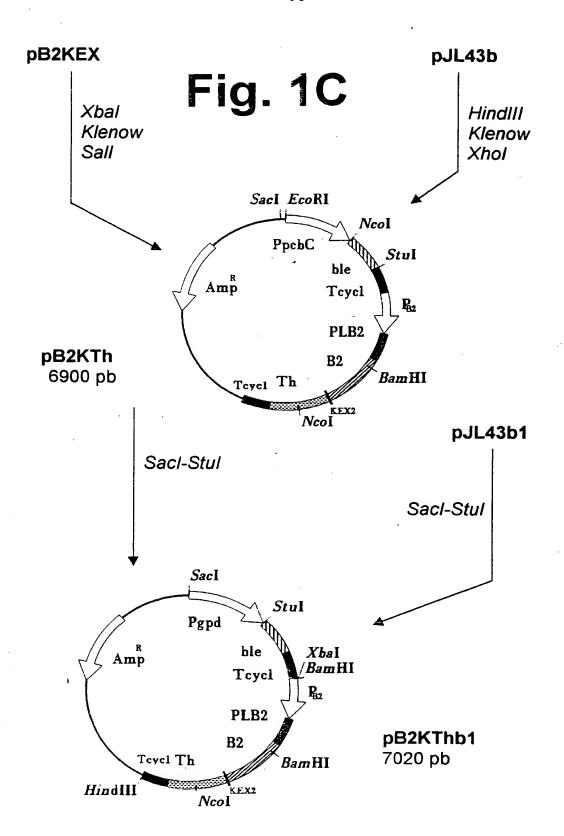
#do:: don le luern JARA











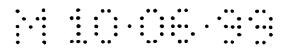
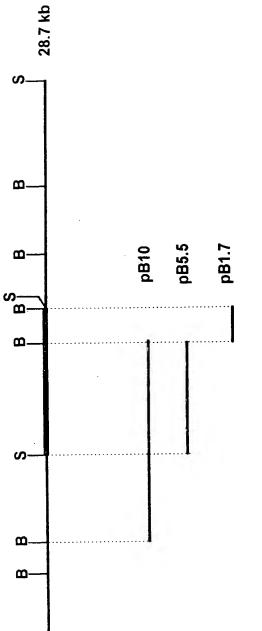


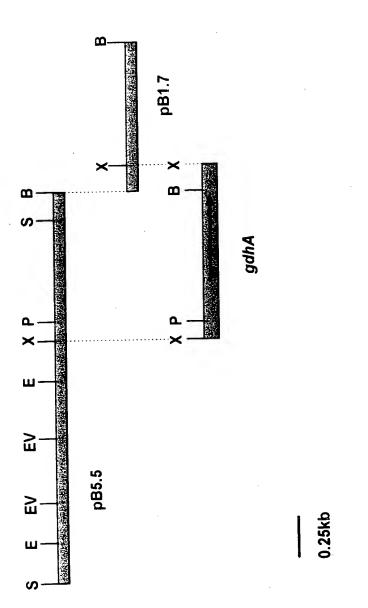
Fig. 2



1.7 kb



Fig. 3



MSN..L......PVEPEFEQAYKELASTLENSTLFEQHPEYRRA..LQVVSVPE

SN..L......BSEPEFEÇÄYKELAYTLENSSLFÇKHPEYRTA.,LTVASIPE MS.........EPEFQÕÄYEEVVSSLEDSTLFECHPEYRKV.,LPIVSVPE MIKNGL....PHEPEFQQÄYNELVSALEESTLFTEKPEYKKV.,IPVVSIPE

......PHEPEFEQAYKELASTLENSTLFOKNPEYRKA..LAVVSVPE

MV...L......PHEPEFEQALHELETSLQ..PFLTTMPQYKKA..LEIIQVPE

Schwanniomyces occidentalis

Saccharomyces cerevisiae

Aspergillus awamori Aspergillus nidulans

Veurospora crassa

Corynebacterium glutamicum

Salmonella typhimurium

Escherichia coli

Agaricus bisporus

MDQTCSLESFLNHVQKRDPHQTEFAQAVREVMTTL..WPFLEQNPRYRHMSLLERLVEPE MDQTYSLESFLNHVQKRDPNQTEFAQAVREVMTTL..WPFLEQNPKYRQMSLLERLVEPE MTVDEQVSNYYDMLLKRNAGEPEFHQAVAEVLESL..KLVLÆKDPHYADYGLÍQRLCEPE

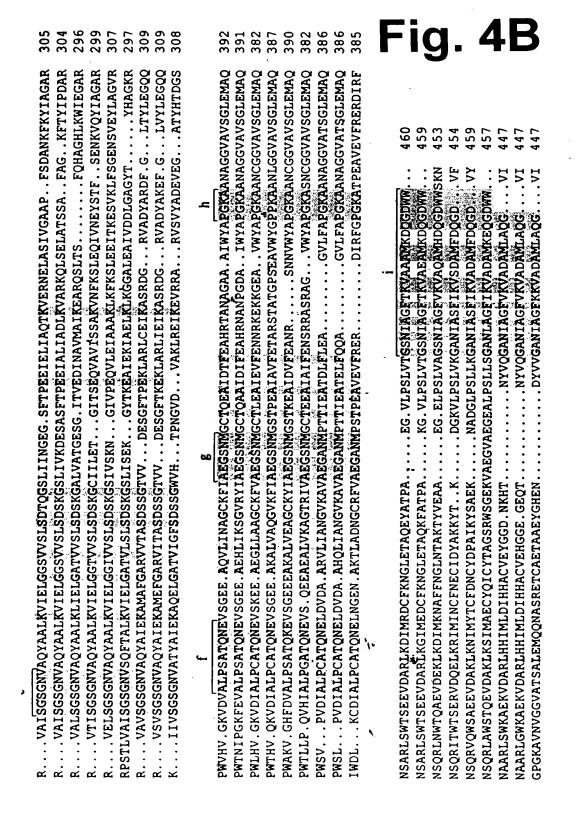


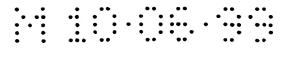
## Fig. 4A

RVIOERVVWENDKGEVQINRGYRVQFNSALGPYKGGLRFHPSVNLSILKFLGFEQIFKNALTGLNMGGGKGG.SDFDPKGKSDSEIRRFC RVIOERVVWEDDNGNVQVNRGYRVQFNSALGPYKGGLRLHPSVNLSILKFLGFEQIFKNALTGLSMGGGKGG.ADFDPKGKSDAEIRRFC RIIQERVTWENDKGEQEVAQGYRVQYNSAKGEYKGGLRFHPSGNLSILKFLGFEQIFKNSLTGLDMGGGKGGLC.VDLKGRSNNEIRRIC RIIQERVAWENDNGDVEVNNGFRVQFNSSLGPYKGGLRFHPSVNLSILKFLGFEQIFKNALTGLSMGGGKGG.CDFNPKGRSDGEIRRFC 3VIOERYVWEDDAGNVQVNRGFRYQFNSALGPYKGGLRFHPSVNLSILKFLGFEQIFKNALTGLNMGGGKGG. SDFDPKGKSDNEIRRFC RVLOERVINEDDOGKPOVNRGFRYOYNGALGPYKGGLRLHPTVNLSILKFLGFEOTEKNALTGLSMGGGKGG.SDFDPKGKSDNEIRRFC NIONENTILDDKNOVOVNRAWRYGENSAIGPYKGGMRFHPSVNLSILKFLGFEQTFKNALTTLPMGGGKGG. SDFDPKGKSEGEVMRFC VIOERWVWVDDRNOIQVNRAWRVQFSSAIGPYKGGMRFHPSVNLSILKFLGFEQTFKNALTTLPMGGGKGG.SDFDPKGKSEGEVMRFC <mark>k</mark>oliervervodogovhvnrgfrvofnsalgpykgglrfhpsvnlgivkflgfeoifknsltglpigggkgg, sdfdpkgksdleimrfc

VAFNSEÜFRHIGODTÖVEÄGDIGTGAREIGFLFGAYRRLKNEFTG. MLTGKGINWGGSFIRPEATGYGLIYYVEHMIAHACPE...YSLD QALMTENYRHLGPDTÖVPÄGDIGVGERGVGFMAGMMRKLSN.NSSCVFTGKGLSFGGSLIRPEATGYGLVYFTEAMLKRHGLG...FEGM VSFMTELCKHIGADTDVPAGDIGVTGREVGFLFGQYRKIRNQWEG.VLTGKGGSWGGSLIRPEATGYGVVYVEHMIAHATNGQESFKGK TAFMTELCKHIGADTDVPAGDIGVTGREVGFLFGQYRRIRNQWEG.VLTGKGGSWGGSLIRPEATGYGVVYVVQHMIKHVTGGKESFAGK CAFMAELHKHIGADTDVPAGDIGVGGREIGYMFGAYRKAANRFEG. VLTGKGLSWGGSLIRPEATGYGLVYYVGHMLEY... SGAGSYAGK Vafurojaryi gadtover golgogrei gylfgaykomonnwyg. Vltgkgltwggslirpeatgyvsfttlkkmi ekatngkesfkgk Oal<mark>ù</mark>teëyrhlgadt<u>dwpagdi</u>gvggrevgfmagmmkklsn.ntacvftgkglsfggslirpeatgyglvyfteamlkrhgmg...fegm **osfäteä**hrhi**geyröndädig**vggr**e**igylfghyrrmanohesgvl**tgkgl**twggslvrteatgygcvyfvsemikakges...isgo yafmrejskhiçodtövpacdigvggreigylfgayrsyknsweg. Vlickginwggslirpeatgygllyytoamidyatngkesfegk

:





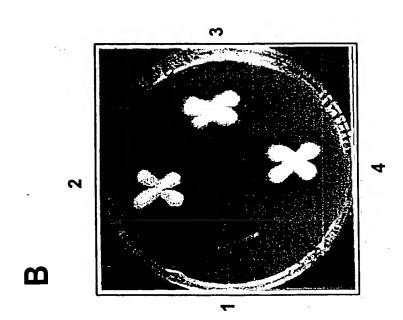
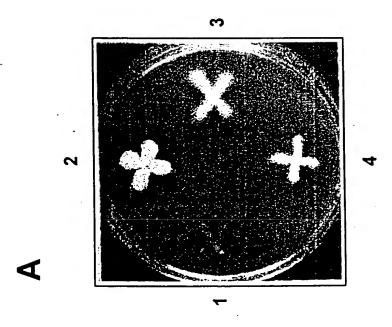
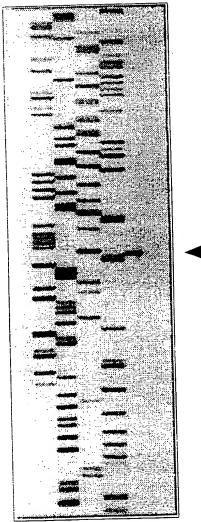


Fig. 5









←— gdhA

Fig. 6



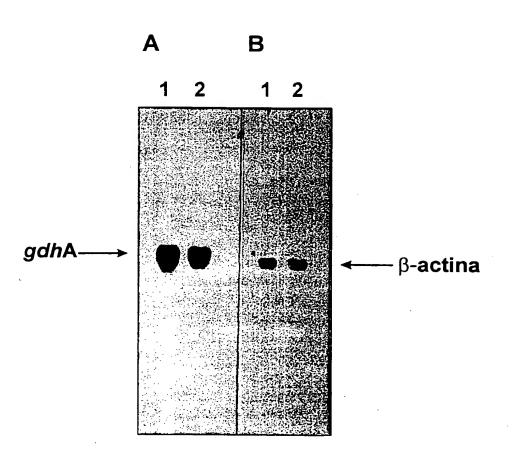
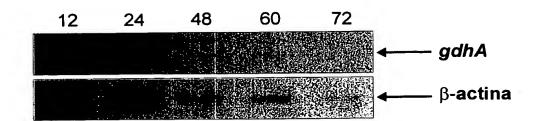


Fig. 7







## В

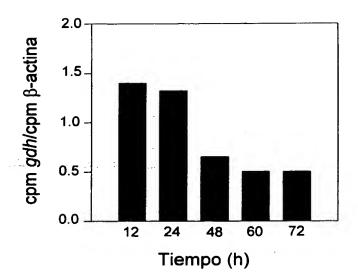
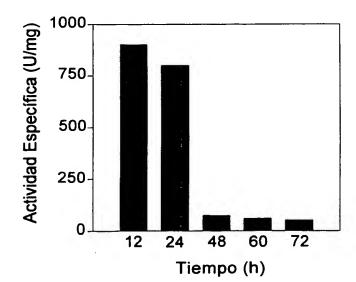
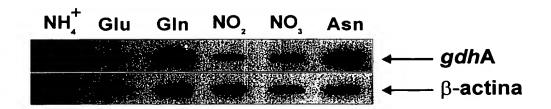


Fig. 8









B

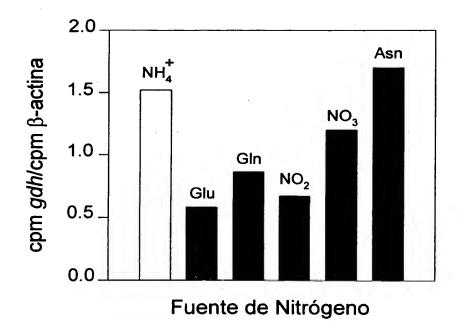
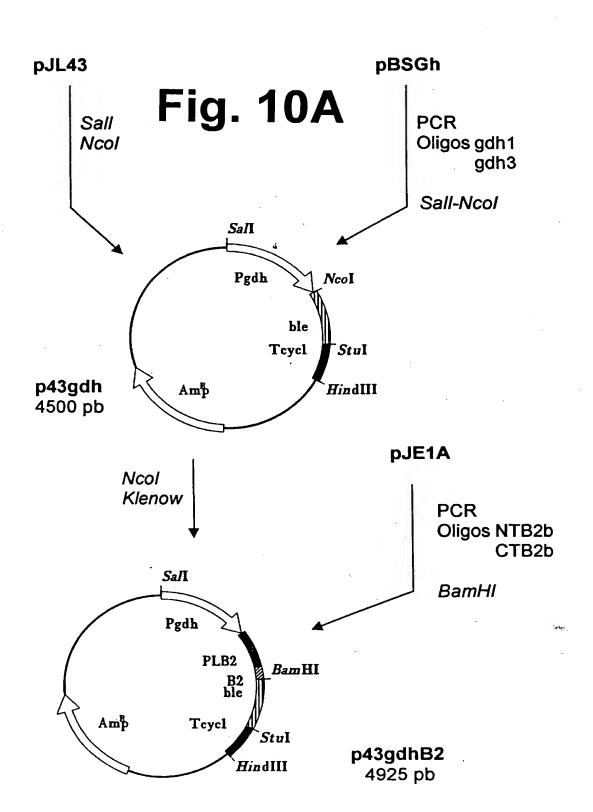
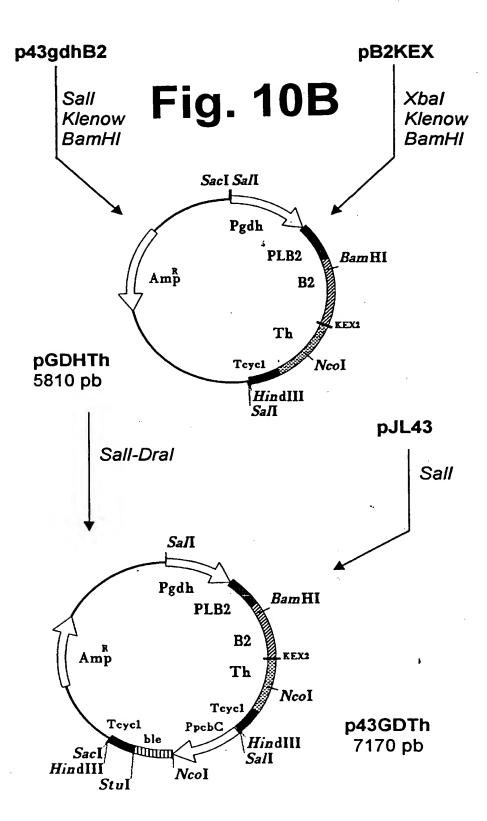
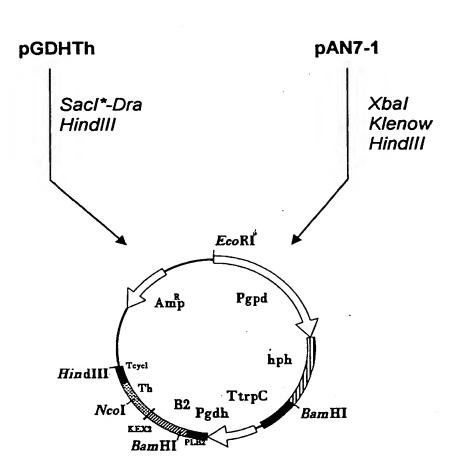


Fig. 9





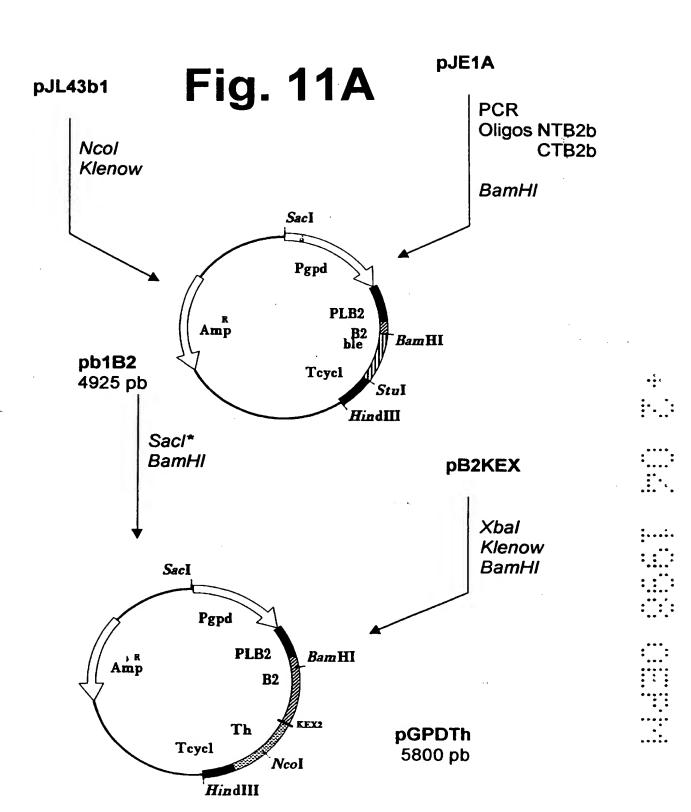


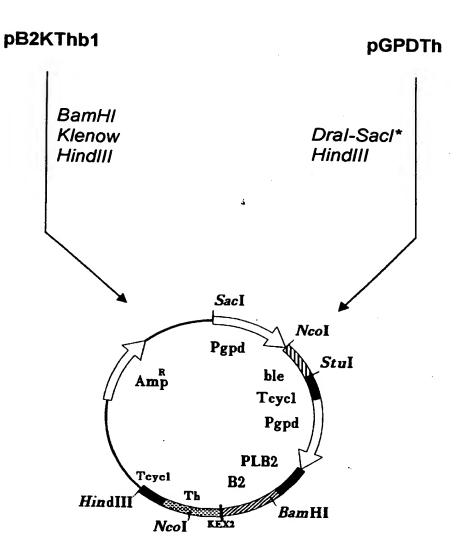


**PGD71** 9400 pb

Fig. 10C







**pGPThb1** 7300 pb

Fig. 11B



TB2b1-44 y TGDTh-4

